

---

Lehrstuhl für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie  
Universität Regensburg  
Prof. Dr. med. H. F. Grobecker

---

Pharmakologische, molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Beeinflussung des Renin-Angiotensin-Systems und der renalen Cyclooxygenase- und NO-Synthase-Isoenzyme in der Frühphase der primären, genetisch bedingten und sekundären, Immunsuppressiva-induzierten Hypertonie.

---



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Apothekerin Franziska Dreher  
aus Regensburg

2002

---

---

## **Promotionsgesuch**

Eingereicht am: 12. Juni 2002

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. F. Grobecker

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. med. A. Kurtz

Mündliche Prüfung: 12. Juli 2002

Die Arbeit wurde angeleitet von Herrn Prof. Dr. med. H. Grobecker.

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. rer. nat. G. Märkl

Prof. Dr. med. H. F. Grobecker

Prof. Dr. med. A. Kurtz

Prof. Dr. med. B. K. Krämer

---

Die Dissertation entstand unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. H. F. Grobecker in der Zeit von August 2000 bis Juli 2002 am Lehrstuhl für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Universität Regensburg.

Mein ganz besonderer Dank gilt  
meinem  
akademischen Lehrer

**Prof. Dr. med. H. F. Grobecker**

für die Überlassung des Themas und eines Arbeitsplatzes an seinem Lehrstuhl. Seine wissenschaftliche und persönliche Betreuung der Arbeit ermöglichten die Anfertigung dieser Dissertation unter idealen Bedingungen und waren stets eine große Hilfe.

Danken möchte ich des Weiteren:

**Herrn Prof. Dr. med. A. Kurtz**

für die Möglichkeit, die Einrichtungen seines Lehrstuhls nutzen zu dürfen, für die Unterstützung bei der histologischen Präparation und der Immunhistochemie der Nierenschnitte und für seine freundliche Hilfe bei der Bewertung der Ergebnisse.

**Herrn Prof. Dr. F. Kees**

für seine Mithilfe bei der HPLC-Analytik.

**Herrn Dr. rer. nat. K. Höcherl**

für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, für seine hilfsbereite und freundliche Unterstützung und für die Mithilfe und Diskussionsbereitschaft bei der Planung, der Auswertung und der Beurteilung der Ergebnisse.

**Herrn Dr. med. M. Bucher**

für die umfangreiche Einführung in operative Techniken.

**Frau G. Wilberg und Frau A. Seefeld**

für die engagierte und gewissenhafte Mithilfe bei der Vorbereitung und Durchführung der Versuche.

Meinen Kollegen

**Herrn Dr. J. Köhler und Herrn S. Ladenburger,**  
sowie

**Frau R. Prenzyna und Frau S. Kirsch**  
für die freundliche Zusammenarbeit im Team.

**Allen Kollegen,**

die am Gelingen der Arbeit beteiligt waren und deren Namen hier nicht ausdrücklich erwähnt werden.

---

**Meinen Eltern  
und  
Alexander**

<b>Inhaltsverzeichnis</b>
---------------------------

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1	Hypertonie.....	10
1.1.1	Risikofaktor Hypertonie.....	10
1.1.2	Definition der Hypertonie und Risikofaktoren.....	11
1.1.3	Primäre und sekundäre Hypertonie.....	12
1.1.4	Die medikamentös bedingte, sekundäre Hypertonie.....	13
1.1.5	Immunsuppressiva-induzierte sekundäre Hypertonie.....	14
1.2	Blutdruckregulation.....	15
1.2.1	Die Rolle der Nieren in der Pathogenese der Hypertonie.....	15
1.2.2	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....	15
1.2.3	Physiologische Regulation der Reninsynthese und –freisetzung.....	17
1.3	Die NO-Synthase.....	20
1.3.1	NO-Synthase-Isoenzyme und ihre Funktion.....	20
1.3.2	Lokalisation von eNOS- und nNOS-Isoenzymen in der Niere.....	20
1.4	Die Cyclooxygenase.....	21
1.4.1	Struktur und Funktion der Cyclooxygenase.....	21
1.4.2	Unterschiede in Lokalisation und Funktion der COX-Isoenzyme.....	22
1.4.3	Lokalisation der Cyclooxygenase-Isoenzyme in der Niere.....	22
1.4.4	Signaltransduktionswege zur Induktion der COX-2.....	23
1.5	Immunsuppressiva.....	25
1.5.1	Die T-Zellrezeptor-vermittelte Signaltransduktion.....	25
1.5.2	Die Proteinphosphatase Calcineurin: Aktivierung, Struktur und Funktion.....	25
1.5.3	Der Transkriptionsfaktor NFAT.....	26
1.5.4	Die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus.....	28
1.5.5	Die mTOR-Hemmer Rapamycin und SDZ-RAD.....	30
<b>2</b>	<b>Problemstellung</b>	<b>32</b>
2.1	Die primäre, genetisch bedingte Hypertonie.....	32
2.1.1	Die spontan hypertensive Ratte als Modell der primären Hypertonie.....	32
2.1.2	Untersuchungen zur Frühphase der primären, genetisch bedingten Hypertonie.....	32
2.2	Die sekundäre, Immunsuppressiva-induzierte Hypertonie.....	34
2.2.1	Hypertonie und Nephrotoxizität als Nebenwirkungen der Calcineurin-Hemmung.....	34
2.2.2	Untersuchungen zur Frühphase der sekundären, Immunsuppressiva-induzierten Hypertonie: Calcineurin-Inhibitoren und mTOR-Hemmer.....	36
<b>3</b>	<b>Materialien</b>	<b>37</b>
3.1	Versuchstiere.....	37
3.1.1	Normotensive Wistar- Kyoto- Ratte (WKY).....	37
3.1.2	Spontan hypertensive Ratte (SH-Ratte, SHR).....	37
3.2	Chemikalien und Pharmaka.....	37

3.2.1	Chemikalien.....	37
3.2.2	Pharmaka.....	38
3.3	Lösungen und Suspensionen der applizierten Arzneistoffe.....	38
3.4	Strukturformeln der applizierten Arzneistoffe.....	39
3.5	Geräte.....	40
3.6	Kommerzielle analytische Tests.....	42
3.7	Statistik.....	42
<b>4</b>	<b>Methode</b>	<b>43</b>
4.1	Tierhaltung.....	43
4.2	Plethysmographische Messung des systolischen Blutdrucks.....	43
4.3	Tötung der Versuchstiere und Organentnahme.....	44
4.4	Isolierung der RNA.....	44
4.5	Quantifizierung der RNA.....	45
4.6	Quantifizierung der mRNA mit dem Protection Assay.....	46
4.6.1	Prinzip.....	46
4.6.2	Herstellung der radioaktiv markierten cRNA-Sonde zur Detektion von COX-1-, COX-2-, NOS I- und NOS III-mRNA.....	46
4.6.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien („Maxi Prep“).....	46
4.6.2.2	Kontrollverdau der Plasmide.....	46
4.6.2.3	In-vitro-Transkription.....	47
4.6.3	Hybridisierung der RNA-Proben.....	48
4.6.4	RNase Protection Assay.....	48
4.6.5	Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	49
4.6.6	Signalauswertung und Entwicklung der Röntgenfilme.....	49
4.7	Western Blot.....	50
4.7.1	Proteinaufbereitung aus den Geweben.....	50
4.7.2	Kolorimetrische Proteinbestimmung nach Lowry.....	50
4.7.3	Auftrennung von Proteinen mit SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	51
4.7.4	Transfer aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose (Western Blot).....	52
4.7.5	Blockierung unspezifischer Bindungsstellen.....	53
4.7.6	Immunochemische Detektion der Proteine mittels Chemilumineszenz.....	53
4.8	Bestimmung der Katecholamine des Nierencortex.....	55
4.9	Bestimmung des Plasmakreatinins.....	58
4.10	Bestimmung des Hämatokrits.....	59
4.11	Immunhistochemische Untersuchungen.....	59
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>61</b>
5.1	Genetisch bedingte Hypertonie.....	61
5.1.1	Versuchsmodell.....	61
5.1.2	Entwicklung von Körpergewicht, Futter- und Wasserverbrauch.....	61
5.1.3	Kardiovaskuläre Parameter.....	61
5.1.3.1	Altersentwicklung von Blutdruck und Herzfrequenz.....	61
5.1.3.2	Relatives Herzgewicht.....	62
5.1.3.3	$\beta$ -/ $\alpha$ -Myosin-Ratio im Herzen.....	62
5.1.4	Renale Parameter.....	63
5.1.4.1	Relatives Nierengewicht.....	63
5.1.4.2	Katecholamine in der Nierenrinde.....	63

5.1.5	Renin mRNA Genexpression, Plasmarenin-Aktivität und Plasmaaldosteron-Konzentration bei 3 und 7 Wochen alten SHR und WKY.....	64
5.1.6	Organverteilung der COX-1 und COX-2 bei 7 Wochen alten SHR und WKY.....	65
5.1.6.1	Organverteilung der COX-1.....	65
5.1.6.2	Organverteilung der COX-2.....	66
5.1.7	Gen- und der Proteinexpression von COX-1 und COX-2 in den Nieren 3 und 7 Wochen alter SHR und WKY.....	67
5.1.7.1	Genexpression der COX-1 und -2 in den Nierenzonen.....	68
5.1.7.2	Proteinexpression der COX-1 und -2 im Nierencortex.....	68
5.1.8	Prostaglandin E <sub>2</sub> im Nierencortex von 3 und 7 Wochen alten SHR und WKY.....	69
5.1.9	Organverteilung von eNOS und nNOS bei 7 Wochen alten SHR und WKY...	69
5.1.9.1	Organverteilung der eNOS.....	69
5.1.9.2	Organverteilung der nNOS.....	70
5.1.10	Gen- und Proteinexpression von eNOS und nNOS in den Nieren 3 und 7 Wochen alter SHR und WKY .....	71
5.1.10.1	Genexpression von eNOS und nNOS in den Nierenzonen.....	71
5.1.10.2	Proteinexpression von eNOS und nNOS im Nierencortex.....	72
5.1.11	Hämatokrit.....	72
5.1.12	Tabellarische Übersicht der Ergebnisse.....	73
5.1.13	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	75
5.2	Immunsuppressiva-induzierte Hypertonie: Calcineurin-Inhibitoren versus mTOR-Hemmer.....	78
5.2.1	Versuchsmodell.....	78
5.2.2	Entwicklung von Körpergewicht, Futter- und Wasserverbrauch.....	78
5.2.3	Beeinflussung kardiovaskulärer Parameter durch Immunsuppressiva.....	79
5.2.3.1	Systolischer Blutdruck und Herzfrequenz.....	79
5.2.3.2	Relatives Herzgewicht.....	80
5.2.3.3	Veränderung der $\beta$ -/ $\alpha$ -Myosin-Ratio im Herzen.....	80
5.2.4	Beeinflussung renaler Parameter durch Immunsuppressiva.....	80
5.2.4.1	Relatives Nierengewicht.....	80
5.2.4.2	Plasmakreatinin und Hämatokrit.....	81
5.2.4.3	Katecholamine in der Nierenrinde.....	81
5.2.5	Einfluss der Immunsuppressiva auf die Gen- und Proteinexpression der Cyclooxygenase-Isoenzyme der Nieren.....	82
5.2.5.1	Genexpression von COX-1 und COX-2 in den Nierenzonen.....	82
5.2.5.2	Proteinexpression von COX-1 und COX-2 in den Nieren.....	83
5.2.5.3	Immunhistochemische Färbungen der COX-2 in Papille und Cortex der Niere.....	84
5.2.6	Einfluss der Immunsuppression auf Prostaglandin E <sub>2</sub> in den Nieren.....	85
5.2.7	Beeinflussung der Renin mRNA Genexpression, der Plasmarenin-Aktivität und der Plasmaaldosteron-Konzentration durch Immunsuppressiva.....	86
5.2.8	Einfluss der Immunsuppressiva auf die Gen- und Proteinexpression der endothelialen und neuronalen NO-Synthase-Isoenzyme der Nierenrinde.....	87
5.2.9	Tabellarische Übersicht der Ergebnisse.....	88
5.2.10	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	89
5.3	Einfluss von Cyclosporin A auf die Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems und der renalen COX-2- und nNOS-Isoenzyme.....	91
5.3.1	Versuchsmodell.....	91

5.3.2	Entwicklung von Körpergewicht, Futter- und Wasserverbrauch.....	91
5.3.3	Systolischer Blutdruck und Herzfrequenz.....	92
5.3.4	Renale Parameter .....	93
5.3.4.1	Relatives Nierengewicht.....	93
5.3.4.2	Plasmakreatinin und Hämatokrit.....	93
5.3.4.3	Katecholamine in der Nierenrinde.....	93
5.3.5	COX-1 und COX-2 im Nierencortex.....	94
5.3.5.1	Genexpression der COX-1 und COX-2.....	94
5.3.5.2	Proteinexpression der COX-1 und COX-2.....	94
5.3.5.3	Immunhistochemische Färbung der Cyclooxygenase 2 im Nierencortex.....	95
5.3.6	PGE <sub>2</sub> im Nierencortex.....	96
5.3.7	Renin.....	96
5.3.7.1	Renin Genexpression im Nierencortex und Plasmarenin-Aktivität.....	96
5.3.7.2	Immunhistochemische Färbung des Renins im Nierencortex.....	97
5.3.8	Endotheliale und neuronale NO-Synthase im Nierencortex.....	98
5.3.8.1	Genexpression von eNOS und nNOS.....	98
5.3.8.2	Proteinexpression von eNOS und nNOS.....	99
5.3.9	Tabellarische Übersicht der Ergebnisse.....	100
5.3.10	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	101
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>103</b>
6.1	Diskussion der Ergebnisse zur genetisch bedingten Hypertonie.....	103
6.1.1	Die Entwicklung des Körpergewichts.....	103
6.1.2	Blutdruck, Herzfrequenz und Herzhypertrophie bei SHR.....	103
6.1.3	Die Bedeutung der Niere für die Hypertonie bei SHR.....	104
6.1.4	Die Katecholamine der Niere bei SHR.....	104
6.1.5	Das Renin-Angiotensin-System bei SHR.....	105
6.1.6	Die Cyclooxygenase-Isoenzyme.....	106
6.1.6.1	Organverteilung der COX-1 und COX-2 bei 7 Wochen alten SHR und WKY.....	106
6.1.6.2	COX-1 und COX-2 in den Nieren von SHR und WKY.....	106
6.1.6.3	Zusammenhang zwischen COX-2 und Renin.....	107
6.1.6.4	Prostaglandin E <sub>2</sub> in den Nieren junger SHR.....	108
6.1.7	Die NO-Synthase-Isoenzyme: eNOS und nNOS bei SHR und WKY.....	109
6.1.7.1	NO in der Frühphase der Hypertonieentwicklung bei SHR.....	109
6.1.7.2	Organverteilung von eNOS und nNOS bei 7 Wochen alten SHR und WKY..	110
6.1.7.3	Lokalisation von eNOS und nNOS in den Nieren.....	111
6.1.7.4	eNOS und nNOS in den Nieren bei SHR und WKY: Gemeinsamkeiten und Unterschiede in Gen- und Proteinexpression.....	111
6.1.7.5	NO, COX-2 und Renin.....	112
6.2	Diskussion der Ergebnisse zur Immunsuppressiva-induzierten Hypertonie.....	114
6.2.1	Das Versuchsmodell.....	114
6.2.2	Die verwendeten Dosierungen.....	114
6.2.3	Unspezifische Effekte der systemischen Immunsuppressiva-Applikation.....	114
6.2.4	Einfluss der Immunsuppressiva auf das kardiovaskuläre Systems.....	115
6.2.4.1	Blutdruck und Herzfrequenz.....	115
6.2.4.2	β-/α-Myosin-Ratio.....	115
6.2.5	Einfluss der Immunsuppressiva auf die Nierenfunktion.....	116
6.2.5.1	Nierenfunktion unter SDZ-RAD.....	117



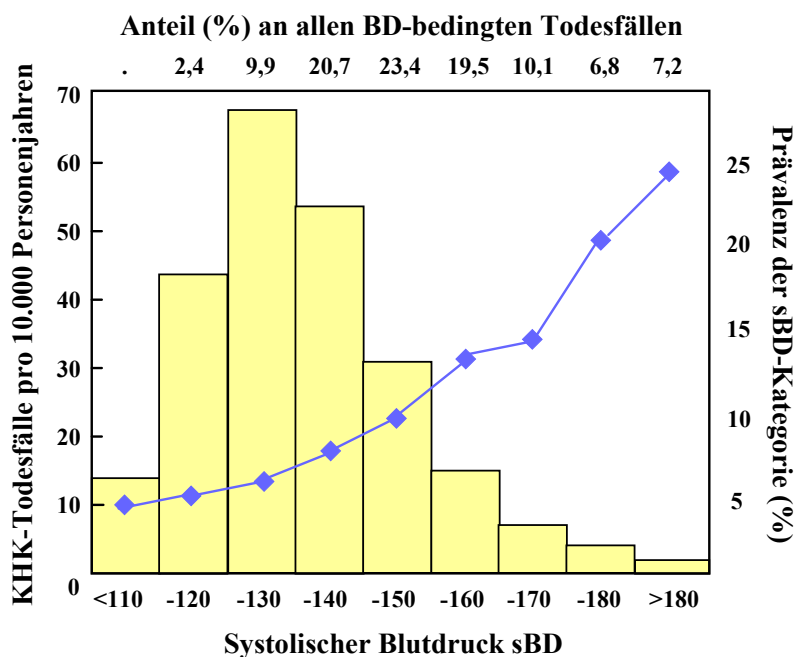
6.2.5.2	Die Aktivität des sympathischen Nervensystems der Niere .....	118
6.2.5.3	Expression der COX-1 und COX-2 in den Nieren.....	118
6.2.5.4	Prostaglandin E <sub>2</sub> in den Nieren.....	120
6.2.5.5	Einfluss der Immunsuppressiva auf das Renin-Angiotensin-System.....	121
6.2.5.6	Gen- und Proteinexpression der endothelialen und neuronalen NO-Synthase bei Immunsuppression.....	122
6.3	Diskussion der Ergebnisse zum Einfluss von Cyclosporin A auf die Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems und der renalen COX-2- und nNOS-Isoenzyme.....	123
6.3.1	Die Stimulation der Cyclooxygenase 2 der Nieren.....	123
6.3.2	Veränderung physiologischer Parameter unter Niedrigsalz bzw. der Kombination von Niedrigsalz und Ramipril.....	123
6.3.3	Calcineurin-Hemmung und verringerte Salzzufuhr.....	124
6.3.4	Blutdruck und Herzfrequenz.....	124
6.3.5	Die renokortikalen Katecholamin-Spiegel.....	125
6.3.6	Cyclooxygenasen und Prostaglandine in der Nierenrinde.....	125
6.3.7	Renin-Synthese und Sekretion.....	126
6.3.8	Endotheliale und neuronale NO-Synthase in der Nierenrinde.....	126
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>127</b>
7.1	Die Frühphase der primären Hypertonie.....	127
7.2	Die Frühphase der Immunsuppressiva-induzierten Hypertonie.....	128
7.3	Der Einfluss von Cyclosporin A auf die Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems und der renalen COX-2- und nNOS-Isoenzyme.....	129
<b>8</b>	<b>Ausblick</b>	<b>130</b>
<b>9</b>	<b>Literatur</b>	<b>131</b>
<b>10</b>	<b>Anhang</b>	<b>149</b>
10.1	Abbildungsverzeichnis.....	149
10.2	Tabellenverzeichnis.....	152
10.3	Abkürzungsverzeichnis.....	153
10.4	Lebenslauf.....	157

## 1 Einleitung

### 1.1 Hypertonie

#### 1.1.1 Risikofaktor Hypertonie

In der Bevölkerung industrialisierter Länder wird das Morbiditäts- und Mortalitätsgeschehen in hohem Maße von Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems bestimmt. Von großer sozialmedizinischer Bedeutung sind hierbei vor allem die arterielle Hypertonie und deren Folgeerkrankungen wie Schlaganfall, koronare Herzkrankheit einschließlich des Myokardinfarktes, Herzinsuffizienz und Nierenerkrankungen. Pro Jahr sterben mehr als 400.000 Menschen an Krankheiten aus dieser Gruppe. Dabei sind etwa 43 % der Betroffenen männlich, und sogar über 50 % weiblich. Herz-Kreislauf-Erkrankungen stehen somit an der Spitze der Todesursachen. Die Wahrscheinlichkeit für zukünftige kardiovaskuläre Komplikationen steigt dabei mit der Höhe des arteriellen Blutdrucks kontinuierlich an (*Stamler et al., 1993*). Es besteht eine exponentielle Beziehung zwischen Blutdruck und kardiovaskulären Krankheitsfolgen. Der systolische Blutdruck ist dabei für ein eventuelles Risiko von größerer Bedeutung als der diastolische Blutdruck (*Gueyffier et al., 1999*).



**Abb. 01** Zusammenhang zwischen der Höhe des systolischen Blutdruckes und der Sterberate an Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Nach Stamler et al., 1993. Die Linie gibt die Sterberate pro 10.000 Personenjahre an (linke Ordinate), die Säulen geben die Häufigkeit der jeweiligen Blutdruck-Kategorie in % (rechte Ordinate) wieder. Die Werte am oberen Rand bezeichnen den Prozentsatz aller blutdrucksteigernden Todesfälle in den einzelnen Kategorien (Übersterblichkeit oder Attributivrisiko; Referenzkategorie SBD < 110 mmHg).

Es zeigt sich deutlich, dass nur ein kleiner Prozentsatz der Betroffenen sehr hohe Blutdruckwerte hat (> 160 mmHg). Die meisten Personen weisen hingegen Blutdrücke von 140 bis 160 mmHg auf. Aufgrund der großen Anzahl von Personen mit mittelgradigen Blutdruckerhöhungen entstammt der größte Teil der in der Bevölkerung auftretenden kardiovaskulären Ereignisse dieser Gruppe (sog. Attributales Risiko) (*Stamler et al., 1993*). Neben der Behandlung von Personen mit sehr hohen Blutdrücken sind deshalb auch bevölkerungsweite Strategien nötig, um das Problem der Hypertonie und die daraus resultierenden Erkrankungen nachhaltig zu bekämpfen (*Rose G; 1992*).

### 1.1.2 Definition der Hypertonie und Risikofaktoren

Eine arterielle Hypertonie liegt vor, wenn bei mindestens zwei Gelegenheitsmessungen an zwei unterschiedlichen Tagen Blutdruckwerte von  $\geq 140$  mmHg systolisch und /oder  $\geq 90$  mmHg diastolisch vorliegen. Diese Definition bezieht sich auf manuelle auskultatorische Messungen im klinischen Umfeld, die durch einen Arzt oder geschultes medizinisches Personal durchgeführt werden (Chalmers et al., 1999).

Definition	Blutdruck systolisch (mmHg)		Blutdruck diastolisch (mmHg)
Normoton	$< 140$	und	$< 90$
Hyperton	$\geq 140$	und/oder	$\geq 90$
Systolisch Hyperton	$\geq 140$	und	$< 90$

**Tab. 01** Normotone versus hypertone Blutdruckwerte in Anlehnung an die WHO/ISH-Leitlinie (WHO/ISH-Guidelines-Subcommittee, 1999).

Selbst bei milden Formen ist die Hypertonie als chronische Erkrankung einzustufen. Neben der Höhe des Blutdruckes wird die Prognose des Hochdruckkranken von einer Vielzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren beeinflusst. Von besonders großer Bedeutung sind die, bei der Risikostratifizierung zu berücksichtigenden, in Tabelle 2 aufgeführten Risikofaktoren.

Risikofaktoren	
beeinflussbar	nicht beeinflussbar
Schweregrad der Hypertonie	Positive Familienanamnese
Rauchen	Alter
Dyslipoproteinämie	- Männer $> 55$ Jahre
Diabetes mellitus	- Frauen $> 65$ Jahre

**Tab. 02** Risikofaktoren zur Risikostratifizierung bei Hypertonie.

Daneben gibt es weitere prognostisch relevante Risikofaktoren. Diese sind zusammen mit Parametern für Endorganschäden und möglichen Folge- und Begleitkrankheiten in Tabelle 3 dargestellt.

Weitere Risikofaktoren	
Übergewicht Körperliche Inaktivität Erhöhtes Fibrinogen	
Parameter für Endorganschäden	Folge- und Begleitkrankheiten
z.B.: Linksherzhypertrophie Arteriosklerotische Plaques an den großen Gefäßen Mikroalbuminurie Proteinurie oder leichte Kreatininerhöhung Hypertensive Retinopathie	z.B.: Koronare Herzkrankheit mit Angina Pectoris oder Myokardinfarkt Herzinsuffizienz Periphere arterielle Verschlusskrankheit Schlaganfall oder TIA Chron. Nierenerkrankung, Proteinurie

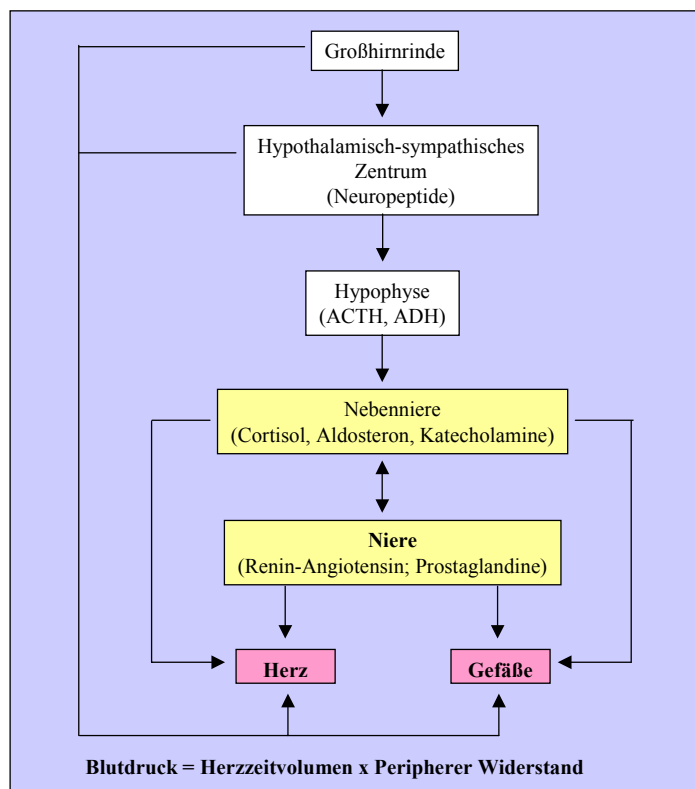
**Tab. 03** Weitere Risikofaktoren, Parameter für Endorganschäden und Folge- und Begleitkrankheiten der Hypertonie.

### 1.1.3 Primäre und sekundäre Hypertonie

Die dem Bluthochdruck zugrunde liegenden Ursachen sind vielfältig. Es ist dabei grundsätzlich zu unterscheiden zwischen der primären Hypertonie, ohne nachweisbare organische Ursache, und der sekundären Hypertonie, die Folge einer Grunderkrankung anderer Organe ist.

#### Die primäre Hypertonie

Bei 90 bis 95 % der Patienten mit Bluthochdruck liegt die primäre bzw. essentielle Form der Hypertonie vor. Ursache für den Bluthochdruck ist hier eine Fehlregulation der an der Blutdruckregulation beteiligten Faktoren.



Als ätiologisch bedeutsame Faktoren werden u.a. diskutiert:

- eine gesteigerte Aktivität der Großhirnrinde und des hypothalamischen, sympathischen Zentrums (Stress-bedingt),
- eine erhöhte Kochsalzzufuhr,
- eine vermehrte Produktion blutdrucksteigernder Stoffe, wie
  - Katecholamine
  - Renin
  - Angiotensin
  - Aldosteron
- und eine verminderte Freisetzung blutdrucksenkender Stoffe, wie
  - Prostaglandine
  - Kinine.

**Abb. 02** Schema der Blutdruckregulation. Nach Werning, 1997. Abkürzungen: ACTH, Adreno-corticotropes Hormon; ADH, Antidiuretisches Hormon, Vasopressin, Adiuretin;

Nicht nur in tierexperimentellen Modellen, z.B. dem der spontan hypertensiven Ratte (SHR), sondern auch anhand von Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien, konnte gezeigt werden, dass die Veranlagung zur essentiellen Hypertonie vererbt wird. Die genaue Anzahl der an der Entstehung des Bluthochdrucks beteiligten Gene ist jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt.

#### Die sekundäre Hypertonie

Im Gegensatz zur primären Hypertonie kommt die sekundäre Hypertonie nur bei 5 bis 10 % aller Patienten mit Bluthochdruck vor. Bei der Entstehung dieser Hypertonieform liegt die den Hochdruck verursachende Grunderkrankung vor allem im Bereich der Nieren, der hormonproduzierenden Organe und des Zentralnervensystems. Es können folgende Arten der sekundären Hypertonie unterschieden werden:

- |  |   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Renoparenchymatöse Hypertonie</li> <li>▪ Endokrine Hypertonie, v.a. Phäochromozytom und Conn-Syndrom</li> <li>▪ Schwangerschaftshypertonie</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Renovaskuläre Hypertonie</li> <li>▪ Kardiovaskuläre Hypertonie, v.a. Aortenisthmusstenose</li> <li>▪ Medikamentös bedingte Hypertonie</li> </ul> |
|--|---|

Die renoparenchymatöse und die renovaskuläre Hypertonie finden sich am häufigsten (ca. 50 % bzw. ca. 30 %). Endokrine Hypertonie ist hingegen nur bei 10 % der Patienten anzutreffen. Zu den selteneren Formen zählen die Schwangerschaftshypertonie, die kardiovaskuläre, und die medikamentös bedingte Hypertonie.

#### 1.1.4 Die medikamentös bedingte, sekundäre Hypertonie

Zu den Arzneistoffen, die eine Blutdruckerhöhung auslösen können, zählen unter anderem:

- **Ovulationshemmer**

Sie stimulieren das Renin-Angiotensin-System und hemmen den Katecholamin-Abbau.

- **Mineralcorticoide**

Mineralcorticoide werden bei primärer Nebennierenrinden-Insuffizienz zusätzlich zu Cortisol substituiert. Da Aldosteron nach oraler Gabe schlecht wirksam ist und injiziert werden müsste, wird das enteral gut wirksame Steroid Fludrocortison (9 $\alpha$ -Fluor-Hydrocortison) verwendet. Es wird im Unterschied zu Cortisol in den Nierentubulus-Zellen nicht durch das Enzym 11- $\beta$ -Dehydrogenase inaktiviert und hat Zugang zu den Mineralcorticoid-Rezeptoren.

Folge: gesteigerte Synthese von Proteinen für den transepithelialen Natrium-Transport, die aktive Rückresorption von Natrium im spätdistalen Tubulus steigt, Kalium wird verstärkt ausgeschieden (Hypokaliämie), Wasser wird retiniert, Ödembildung.

- **Carbenoxolon**

Derivat der Glycyrrhetinsäure der Süßholzwurzel, früher zur Protektion der Magenschleimhaut verwendet. Obsolet wegen mineralcortikoider Nebenwirkung: hemmt das Enzym 11- $\beta$ -Dehydrogenase. Cortisol kann dadurch in den Tubuluszellen zur Wirkung gelangen. Der Aldosteron-Antagonist Spironolacton hemmt Haupt- und Nebenwirkung.

- **Glucocorticoide**

Anwendung zur Substitutionstherapie:

bei einer primären Nebennierenrinden-Insuffizienz Gabe von Cortisol und Mineralcorticoid; bei einer sekundären Nebennierenrinden-Insuffizienz (ACTH-Mangel) genügt Cortisol-Gabe;

Anwendung zur antiinflammatorischen Therapie:

Glucocorticoide wirken antirheumatisch, antiallergisch, immunsuppressiv und hemmen eine Transplantatabstoßung; Die Hypertonie ist Folge der mineralcorticoiden Wirkung und hauptsächlich bei Cortisol-Therapie relevant.

- **Direkte Sympathomimetika**

Agonisten an adrenergen Rezeptoren

$\alpha/\beta_1$ -Sympathomimetika: z.B. Norfenephrin, Etilefrin; Anwendung zur systemischen oder lokalen Vasokonstriktion. Neben der  $\alpha_1$ -Rezeptor-vermittelten Vasokonstriktion kommt es durch  $\beta_1$ -vermittelte Wirkungen am Herzen zur Steigerung von Frequenz, Erregbarkeit, Leitungsgeschwindigkeit, Kontraktionskraft und Sauerstoffbedarf.

- **Cocain**

Hemmung der Noradrenalin-Rückaufnahme in die Präsynapse;

Hohe Konzentrationen von Noradrenalin stimulieren  $\alpha$ - und  $\beta_1$ -Rezeptoren.

- **Nichtsteroidale Antiphlogistika / Antirheumatika**

z.B. Acetylsalicylsäure. Sie können über eine Prostaglandin-Hemmung (z.B. das vasodilatorische PGE<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub>) und über Natriumretention blutdrucksteigernd wirken.

- **MAO-Hemmer**

Bei Patienten, die mit dem nicht-selektiven Monoaminoxidase-Hemmer Tranylcypromin behandelt werden, können die in der Nahrung enthaltenen biogenen Amine nicht mehr abgebaut werden. Dies führt zu gefährlichen Blutdruckkrisen.

Bei den meisten der angesprochenen Wirkstoffe ist die Nebenwirkung der Hypertonie schon länger bekannt und die verantwortlichen Mechanismen sind gut geklärt. Zu einer neueren Wirkstoffklasse, die sekundäre Hypertonie auslöst, gehören die als Immunsuppressiva verwendeten Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus. Die hier an der Entstehung der Hypertonie beteiligten Faktoren sind noch nicht vollständig geklärt. Das zu Grunde liegende Geschehen ist komplex und multifaktoriell.

### **1.1.5 Immunsuppressiva-induzierte sekundäre Hypertonie**

Arterielle Hypertonie ist eine häufige Komplikation nach Organtransplantationen von Herz, Niere, Leber und Knochenmark. Sie wird bei Transplantationspatienten definiert als Blutdruckwerte größer 140/90 mmHg oder als antihypertensive Behandlung (*Zeier et al., 1998*), und ist ein Hauptrisikofaktor für das Überleben von Transplantat und Transplantatempfänger.

Seit der Einführung des Calcineurin-Inhibitors Cyclosporin A 1979 konnte ein dramatischer Anstieg der Häufigkeit von Posttransplantations-Hypertonie beobachtet werden. Während vor Einführung von Cyclosporin A 45-55 % aller Nierentransplantierten mit der Entwicklung einer Hypertonie rechnen mussten, sind heute 67-90 % der mit Cyclosporin A behandelten Patienten davon betroffen. Noch größer wird die Wahrscheinlichkeit einer Hypertonie bei Cyclosporin A-Medikation nach Herztransplantation. Waren hier früher 10 % der Patienten von Bluthochdruck betroffen, so sind es heute 71-100 %. Bei Transplantationen von Leber- und Knochenmark liegt die Häufigkeit seit der Einführung von Cyclosporin A bei 65-85 % bzw. 33-60 % (*Zeier et al., 1998; Textor et al., 1994*), und selbst bei pädiatrischen Patienten ist Hypertonie eine häufige Komplikation nach Nieren- oder Lebertransplantation.

Viele Umstände deuten darauf hin, dass die Calcineurin-Hemmung von entscheidender Bedeutung für die Cyclosporin A-induzierte Hypertonie ist. Auch der seit 1989 vor allem bei Lebertransplantationen eingesetzte, chemisch nicht mit Cyclosporin A verwandte Calcineurin-Inhibitor Tacrolimus (FK506) verursacht Posttransplantations-Hypertonie (*Mihatsch et al., 1998*). Eine weitere Gemeinsamkeit ist, dass beide Wirkstoffe neben der blutdrucksteigernden Wirkung eine nephrotoxische Wirkung besitzen, die ebenfalls zur Hypertonie beitragen kann. Wichtig ist, dass die bei Calcineurin-Hemmung zu beobachtende Hypertonie auch bei nicht transplantierten Patienten auftritt. Dies ist der Fall bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Psoriasis, rheumatoide Arthritis, Uveitis und Myasthenia gravis, mit Calcineurin-Inhibitoren (*Curtis, 1998*).

Die Hinweise auf die mögliche Bedeutung der Calcineurin-Hemmung für die Immunsuppressiva-induzierte Hypertonie und Nephrotoxizität werden im Rahmen der Problemstellung ausführlich dargestellt.

## 1.2 Blutdruckregulation

### 1.2.1 Die Rolle der Nieren in der Pathogenese der Hypertonie

Klinische und experimentelle Studien konnten eine dominante Rolle der Niere bei der langfristigen Blutdruck-Regulation aufzeigen (*Cowley et al., 1996*). Untersuchungen zur Regulation des arteriellen Blutdruckes enthüllten die Bedeutung der renalen Natrium- und Wasserexkretion für die Aufrechterhaltung des arteriellen Drucks im Organismus (*Guyton et al., 1999*). Es konnte bei allen bis zum jetzigen Zeitpunkt untersuchten Hypertonieformen nachgewiesen werden, dass die Nieren einen höheren Perfusionsdruck benötigen um Salz und Wasser auszuschcheiden. Bei Hypertonikern ist dies anhand einer Rechts-Verschiebung der Druck-Natriurese-Beziehung nachweisbar (*Sanai et al., 1996*).

Die Ergebnisse von Nierentransplantationsstudien bestätigen die wichtige Rolle der Niere in der Langzeit-Regulation des arteriellen Drucks und bezüglich der Pathogenese genetischer Formen der arteriellen Hypertonie. Mehrere Forschergruppen konnten demonstrieren, dass es bei der Transplantation der Niere einer genetisch hypertensiven Ratte in eine histokompatible normotensive Ratte zur Auslösung einer arteriellen Hypertonie kommt (*Rettig et al., 1993*). Bei Transplantation der Niere einer normotensiven Donor-Ratte in eine bilateral nephrectomisierte SHR-Ratte konnte, bei gleichzeitiger Immunsuppression, ein in der SHR-Ratte gesenkter arterieller Blutdruck festgestellt werden (*Patschan et al., 1997*).

### 1.2.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist von zentraler Bedeutung für die mittel- bis langfristige Regulation des arteriellen Blutdruckes und der Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushaltes des Organismus. Es kann nach heutigen Erkenntnissen in lokale, parakrine und autokrine Systeme und ein systemisches, neuroendokrines System eingeteilt werden (*Kang et al., 1994*). Lokale Renin-Angiotensin-Systeme wurden außer in den Nieren auch in weiteren Organen wie Gehirn, Herz, Nebennieren, Arterien und dem vaskulären System gefunden (*Yu et al., 1996; Zimmermann et al., 1997*). Die physiologische Bedeutung und die gewebsspezifische Regulation dieser lokalen Renin-Angiotensin-Systeme ist derzeit nur ansatzweise bekannt.

Die Hauptdeterminante für die Aktivität des RAAS ist die Reninsekretionsrate der renalen juxtaglomerulären Epitheloidzellen, dem Hauptproduktionsort von Renin (*Barajas, 1979; Taugner et al., 1984*). Diese, durch metaplastische Transformation reversibel umgewandelten, glatten Muskelzellen finden sich benachbart zum Glomerulus in der Tunica media der afferenten Arteriolen. Ihre Anzahl ist bei einer Stimulation des Reninsystems erhöht, bei einer Supprimierung hingegen verringert (*Taugner et al., 1984*).

Renin entsteht innerhalb der juxtaglomerulären Zellen aus der biologisch inaktiven Vorstufe Präprorenin (401 Aminosäuren), welches im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums durch Abspaltung von 20 Aminosäuren in das enzymatisch inaktive Prorenin (381 Aminosäuren) umgewandelt wird. Prorenin wird zum Teil konstitutiv in die Blutzirkulation sekretiert oder in den Vesikeln des Golgi-Apparates gespeichert. Erst in den Vesikeln erfolgt durch Abspaltung von 46 Aminosäuren am N-terminalen Ende die Aktivierung zu Renin. Dies kann dann durch regulierte Exozytose freigesetzt werden (*Skott, 1986*). Hieran sind auf zellulärer Ebene spezielle Second messenger beteiligt, wie

- cAMP: Steigerung der Reninsekretion,
- $\text{Ca}^{2+}$  und Proteinkinase C: Hemmung der Reninsekretion,
- cGMP: Steigerung und Hemmung der Reninsekretion.

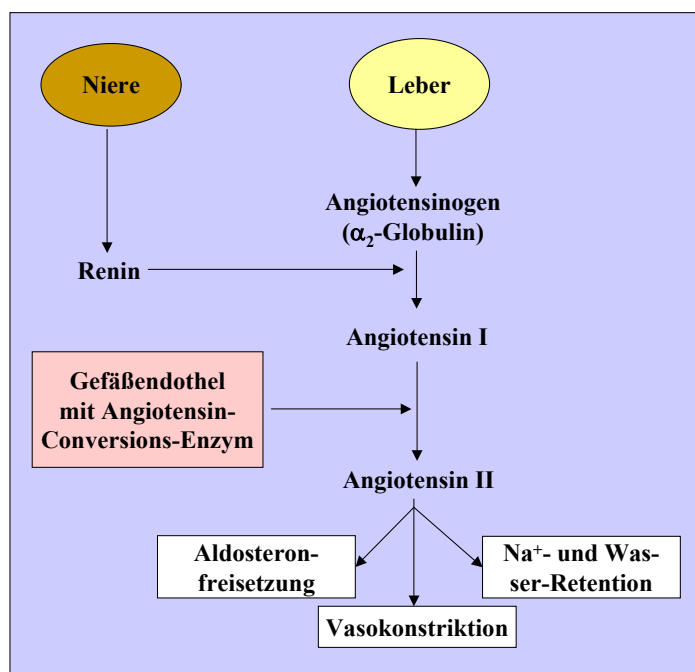


Abb. 03 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).

Die freigesetzte Aspartylprotease Renin ist ein monomeres Glycoprotein, welches aus dem der Leber entstammenden  $\alpha_2$ -Globulin Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I abspaltet. Aus diesem wird dann durch das ubiquitär vorkommende, überwiegend endothelständige (aber auch im Plasma vorkommende) Angiotensin-Conversions-Enzym (ACE) das biologisch aktive Oktapeptid Angiotensin II gebildet. Hierzu werden durch die zinkhaltige Peptidase ACE die zwei carboxyterminalen Aminosäuren Histidin-Leucin hydrolytisch abgespalten. ACE findet sich vor allem in der Lunge. Es spaltet unspezifisch Dipeptideinheiten von Substraten mit unterschiedlichen Aminosäuresequenzen und ist am Bradykinin-Abbau be-

teiligt. Die Wirkungen von Angiotensin II (Tab. 04) werden über die G-Protein-gekoppelten  $AT_1$ - und  $AT_2$ -Rezeptoren vermittelt. Die Rezeptoren sind an der Oberfläche von Plasmamembranen der Zellen der Organe des kardiovaskulären, des endokrinen und des endothelialen Systems lokalisiert (Grobecker, 1999). Dem  $AT_1$ -Rezeptor wird eine entscheidende Funktion bei der peripheren Vasokonstriktion, der Hypertrophie der glatten Muskulatur, der renalen Salz- und Wasserresorption und bei der zentralen Blutdruckregulation zugeschrieben (Grobecker, 1999; Tagawa et al., 1999). Der  $AT_2$ -Rezeptor ist bei der fetalen Entwicklung, der Zelldifferenzierung, der Apoptose und Regeneration von Gewebe (Chung et al., 1998; Csikos et al., 1998; De Gasparo et al., 1999) und der Blutdruckregulation (Carey et al., 2000) wichtig.

Angiotensin II verändert		
den peripheren Widerstand	die Nierenfunktion	kardiovaskuläre Strukturen
Mechanismen	Mechanismen	Mechanismen
<b><u>Direkte Vasokonstriktion</u></b>  <b><u>Steigerung der peripheren noradrenergen Neurotransmission</u></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Erhöhte NA-Freisetzung</li> <li>Verminderter NA-Reuptake</li> <li>Erhöhte vaskuläre Responsiveness</li> </ul> <b><u>Erhöhter sympathischer Tonus (ZNS)</u></b>  <b><u>Katecholamin-Freisetzung aus dem Nebennierenmark</u></b>	<b><u>Direkte Effekte zur Erhöhung der Na<sup>+</sup>-Rückresorption im proximalen Tubulus</u></b>  <b><u>Aldosteronfreisetzung aus der Nebennierenrinde</u></b> (erhöhte Na <sup>+</sup> -Rückresorption und geteigerte K <sup>+</sup> -Exkretion im distalen Tubulus)  <b><u>Veränderte renale Hämodynamik</u></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Direkte renale Vasokonstriktion</li> <li>Erhöhte noradrenerge Neurotransmission der Niere</li> <li>Erhöhter renaler sympathischer Tonus (ZNS)</li> </ul>	<b><u>Nicht hämodynamisch vermittelte Effekte</u></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Erhöhte Expression von Proto-Onkogenen <i>c-fos</i>, <i>c-jun</i>, <i>c-myc</i> und <i>egr-1</i></li> <li>Die Proteine FOS und JUN bilden AP-1: Folge ist erhöhte Bildung von Wachstumsfaktoren und erhöhte Synthese extrazellulärer Matrix</li> </ul> <b><u>Hämodynamisch vermittelte Wirkungen</u></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Erhöhte Nachlast (kardial)</li> <li>Erhöhte Wandspannung (vaskulär)</li> </ul>
Folge	Folge	Folge
<ul style="list-style-type: none"> <li>Schnelle Pressor-Antwort</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Langsame Pressor-Antwort</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Vaskuläre und kardiale Hypertrophie und Remodelling</li> </ul>

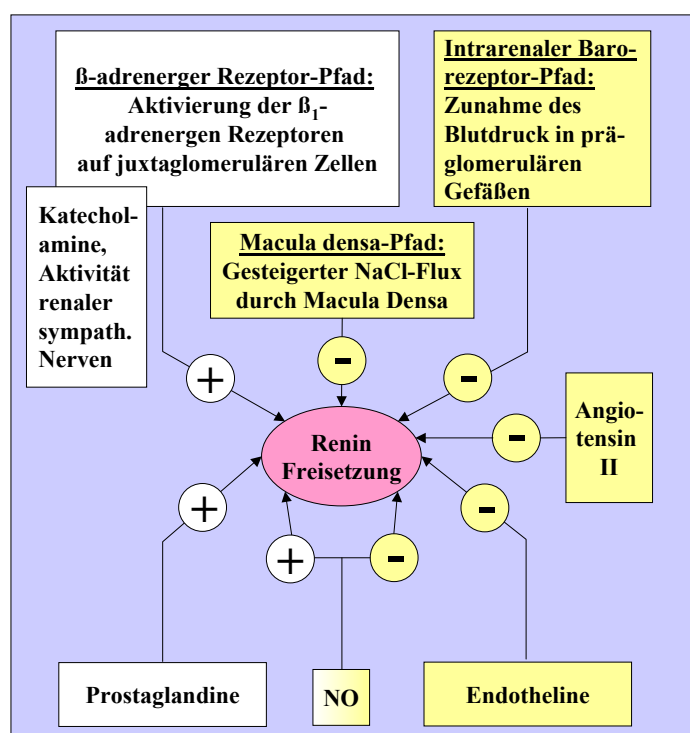
Tab. 04 Die 3 Hauptwirkungen von Angiotensin II. Modifiziert nach Hardman et al., 1998. NA = Noradrenalin.



In Bezug auf die Blutdruckerhöhung ist Angiotensin II ca. 40 mal potenter als Noradrenalin. Die durch Angiotensin II hervorgerufene rasche Steigerung des totalen peripheren Widerstands (schnelle Pressor-Antwort) dient dazu, den arteriellen Blutdruck in hypotonen Krisen (Vasodilatation, Blutverlust) zu stabilisieren. Die langsame Pressor-Antwort ist hingegen für die langfristige Blutdruck-Stabilisierung entscheidend.

### 1.2.3 Physiologische Regulation der Reninsynthese und -freisetzung

Die regulierte Exozytose des aktiven Renins wird durch eine Vielzahl intrarenaler und systemischer Faktoren reguliert (*Wagner et al., 1998*). Im Gegensatz hierzu ist über die Regulation der Reninsynthese der juxtaglomerulären Zellen nur wenig bekannt. Aufschlussreich ist in dieser Hinsicht der Vergleich von renaler Renin-Freisetzungsrate und renalem Reningehalt. Die Renin mRNA Genexpression kann dabei als Indikator der Reninsynthese verwendet werden (*Della Bruna et al., 1996*).



**Abb. 04** Physiologische Regulation der Reninsekretion (+ = Steigerung; – = Hemmung).

An der physiologischen Regulation der Reninsynthese und der Renin-freisetzung sind folgende Faktoren und Mechanismen beteiligt:

- zirkulierendes Angiotensin II,
- der intrarenale Blutdruck,
- das NaCl-Angebot im distalen Tubulus,
- das sympathische Nervensystem,
- Prostaglandine,
- Stickstoffmonoxid,
- Endotheline,
- und weitere hier nicht erwähnte.

#### Angiotensin II

ANG II verursacht anhand eines negativen Feedback-Mechanismus eine direkte Hemmung der Reninsekretion und der Reningenexpression (*Hackenthal et al., 1990; Johns et al., 1990*).

#### Intrarenaler Blutdruck (Barorezeptor-Pfad)

Die in der Niere lokalisierten Barorezeptoren registrieren den renalen Perfusionsdruck. Ein Abfall des Perfusionsdrucks bewirkt eine Steigerung der Reninsekretion (*Taugner et al., 1984*) und der Renin mRNA Genexpression (*Moffet et al., 1986*).

#### NaCl-Angebot im distalen Tubulus (Macula densa-Pfad)

Die Macula densa (MD) grenzt direkt an die juxtaglomerulären Zellen. Es handelt sich bei der MD um säulenförmige Epithelzellen des kortikalen, dicken aufsteigenden Astes der Henleschen Schleife, der zwischen der afferenten und efferenten Arteriole in Kontakt mit dem eigenen Glomerulus tritt. Eine Veränderung der Ionenzusammensetzung der distalen, tubulären Flüssigkeit wird durch die MD registriert und durch weitgehend ungeklärte, chemische

Signalmechanismen an die Renin-produzierenden juxtaglomerulären Zellen weitergeleitet (Hackenthal et al., 1990). Je mehr NaCl dem Organismus zugeführt wird, desto weniger Renin wird freigesetzt (negative Rückkopplung) (Davis et al., 1976; Modena et al., 1993). Auch die Renin mRNA Genexpression verhält sich umgekehrt proportional zur Kochsalzaufnahme (Holmer et al., 1993).

### **Sympathisches Nervensystem (β-adrenerger Rezeptor-Pfad)**

Durch Aktivierung β-adrenerger Rezeptoren wird die cAMP-Bildung gesteigert. Dies stimuliert die Freisetzung von Renin und die Genexpression von Präprorenin (Hackenthal et al., 1990). Denervierung und Blockade von β-Rezeptoren hemmen beide Prozesse (Holmer et al., 1997), Isoprenalin (β<sub>1</sub>/β<sub>2</sub>-Stimulation) verstärkt sie hingegen (Dzau et al., 1988).

### **Regulation des Reninsystems durch humorale und lokale Faktoren**

Vasodilatierende Substanzen	Vasokonstriktorische Substanzen
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bradykinin</li> <li>▪ Dopamin</li> <li>▪ Prostaglandine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Adenosin</li> <li>▪ Atrialer Natriuretischer Faktor ANP</li> <li>▪ Plättchen aktivierender Faktor PAF</li> <li>▪ Vasopressin (=ADH, Antidiuretisches Hormon)</li> </ul>
<b>stimulieren</b> die Reninfreisetzung und Renin-genexpression	<b>hemmen</b> die Reninfreisetzung
Keeton et al., 1981; Jensen et al., 1996	Keeton et al., 1981; Kurtz et al., 1986a/b, 1988b

**Tab. 05** Regulation des Reninsystems durch humorale und lokale Faktoren.

### **Prostaglandine**

Es ist bekannt, dass Prostaglandine sowohl in vitro, als auch in vivo potente Stimulatoren der Reninsekretion sind (Keeton et al., 1981). Besonders die aus der Macula densa stammenden Prostaglandine E<sub>2</sub> und Prostacyclin PGI<sub>2</sub> stimulieren die Reninsekretion und Reningenexpression auf der Ebene der JG-Zellen, welche den Macula densa-Zellen direkt benachbart sind (Beierwaltes et al., 1982b; Freeman et al., 1984).

### **Endotheline**

Endotheline werden gebildet von glatten Muskelzellen, Mesangialzellen, tubulären Zellen und auch von juxtaglomerulären Zellen (Chen et al., 1993). Sie sind die stärksten der bis jetzt bekannten Vasokonstriktoren. Obwohl sie in vitro sowohl die Sekretion als auch die Genexpression von Renin hemmen (Ritthaler et al., 1996), konnte bei Endothelinantagonisten weder eine Beeinflussung der Reningenexpression, noch der Plasmapreninaktivität festgestellt werden (Krämer et al., 1996).

### **Stickstoffmonoxid (NO)**

Über die direkten stimulatorischen Effekte von NO auf das Reninsystem liegen widersprüchliche Berichte vor (Schricker und Kurtz, 1996; Schricker et al., 1996; Schnackenberg et al., 1997).

Dennoch ist ein überwiegend stimulatorischer Gesamteinfluß von NO auf das Reninsystem allgemein anerkannt. NO wird im Bereich der juxtaglomerulären Zellen sowohl im Endothel der afferenten Arteriole (eNOS) als auch in der Macula densa (nNOS) gebildet (*Bachmann et al., 1995; Mundel et al., 1992*). Dass für die Stimulation des Reninsystems in erster Linie das vom Endothel gebildete NO von Bedeutung ist, konnte anhand von e- und nNOS-Knock-out Mäusen gezeigt werden (*Wagner et al., 2000*).

Die Expression der nNOS-Isoform kann durch Salzangel, ACE-Blockade oder renale Hypoperfusion parallel mit der Reninexpression reguliert werden, die der eNOS hingegen nicht (*Cheng et al., 1999; Wolf et al., 1999; Yang et al., 1998; Singh et al., 1996; Schricker et al., 1996; Bosse et al., 1995*). Durch Versuche mit isoliert perfundierten Nieren konnte aufgezeigt werden, dass NO die Reninsekretion über einen cGMP/cGMP-Kinase Weg hemmen, jedoch über einen cAMP/cAMP-Kinase Weg gleichzeitig stimulieren kann (*Kurtz et al., 1998*). Dabei überwiegt jedoch unter normalen Bedingungen der stimulatorische Effekt.

### 1.3 Die NO-Synthase

#### 1.3.1 NO-Synthase-Isoenzyme und ihre Funktion

Die Bildung von endogenem NO wird katalysiert durch das Enzym NO-Synthase (*Michel et al., 1997*). Durch Oxidation des terminalen Guanidino-Stickstoffatoms der Aminosäure L-Arginin wird unter Bildung von L-Citrullin NO produziert. Drei Isoformen der NO-Synthase sind dabei bis heute identifiziert worden. Sie unterscheiden sich voneinander aufgrund der Aminosäuresequenz (nur zu 50-60% identisch), der Gewebeverteilung, der zellulären Lokalisation und der Art ihrer Regulation (*Salvemini, 1997*). Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) und die neuronale NO-Synthase (nNOS) sind Calcium/Calmodulin-abhängig und werden als konstitutive NOS-Isoformen (cNOS) klassifiziert. Während die neuronale NO-Synthase im zentralen und peripheren Nervensystem und auch in einer Vielzahl nicht-neuronaler Zelltypen lokalisiert ist, kommt die endotheliale NO-Synthase in den Endothelzellen der Gefäße aber auch in vielen Nicht-Endothelzellen vor (*Millatt et al., 1999*). Subzellulär liegt die nNOS im Cytoplasma vor, während die eNOS in der Plasmamembran zu finden ist. Die dritte NO-Synthase, die wie die nNOS im Zytoplasma vorkommt, ist die durch Cytokine induzierbare, Calcium/Calmodulin-unabhängige iNOS (*Moncada et al., 1995*).

Die unterschiedlichen Eigenschaften der NO-Synthase-Isoenzyme sind von wichtiger Bedeutung, da Ausmaß, Dauer und zelluläre Lokalisation der NO-Bildung die physiologischen oder pathophysiologischen Effekte des NO bestimmen. So spielt das von der konstitutiven e- und nNOS in kleinen Mengen (pmol) gebildete und kurzfristig freigesetzte NO eine entscheidende Rolle für das kardiovaskuläre System. Es ist dort u.a. für die Durchblutung der Organe, für die Hemmung der Aggregation und der Adhäsion von Blutplättchen an der Gefäßwand, für die Hemmung der Leukocyten-Aggregation und für die Proliferation glatter Muskelzellen zuständig (*Moncada et al., 1995*). Im Gegensatz hierzu wird die iNOS in einer Vielzahl von Zellen erst durch Stimuli wie Cytokine und Lipopolysaccharide exprimiert. Daraus resultiert eine i.d.R. zeitlich verzögerte, aber langanhaltende Synthese sehr großer NO-Mengen im nanomolaren Bereich. Die iNOS ist daher an unzähligen pathologischen Vorgängen entscheidend beteiligt (*Moncada et al., 1995; Clancy et al., 1995; Kroncke et al., 1995*). Es muss trotzdem erwähnt werden, dass auch unter basalen Bedingungen, z.B. in der Aorta von reifen SH-Ratten, eine mit steigendem Alter zunehmende iNOS-Expression nachgewiesen werden konnte (*Chou et al., 1998*).

#### 1.3.2 Lokalisation von eNOS- und nNOS-Isoenzymen in der Niere

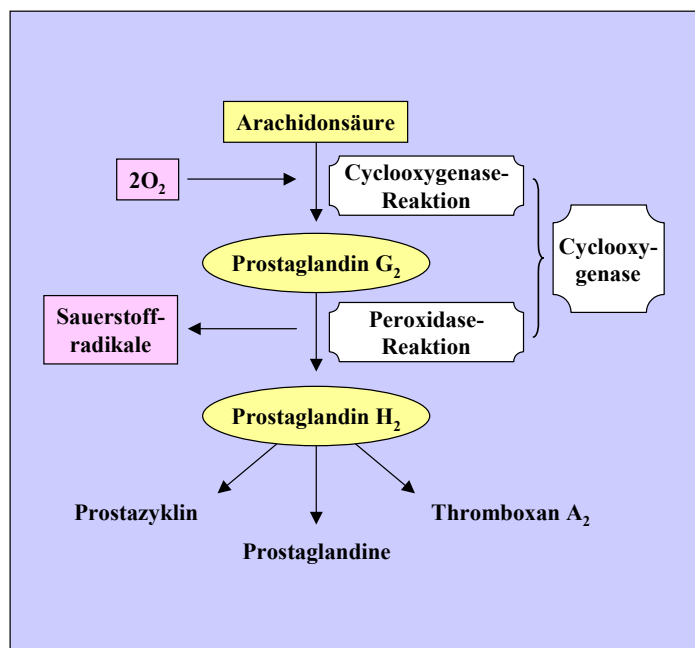
nNOS	eNOS
Besonders stark in Mecula densa Zellen  außerdem noch in geringem Maß in einigen benachbarten Zellen des TALH in Zellen der Bowmanschen Kapsel in einigen intrarenalen Nerven in tubulären Strukturen	bevorzugt in Interlobulararterien/afferenten Arteriolen und im Glomerulus
Wilcox et al., 1992 ; Tojo et al., 1992 ; Bachmann et al., 1995	Ujiie et al., 1994

**Tab. 06** Lokalisation der eNOS- und nNOS-Isoenzyme in der Niere.

## 1.4 Die Cyclooxygenase

### 1.4.1 Struktur und Funktion der Cyclooxygenase

Die auch als Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase bezeichnete Cyclooxygenase ist das Schlüsselenzym der Eicosanoid-Biosynthese. Als bifunktionelles Membranprotein katalysiert sie in 2 Reaktionsschritten die Umwandlung der hydrolytisch aus Membranphospholipiden freigesetzten Arachidonsäure zu Prostaglandin  $H_2$  (Smith et al., 2000).



Dazu wird in einem Bisoxxygenierungsschritt, der sog. Cyclooxygenase-Reaktion, das zyklische Hydroperoxy-Endoperoxid Prostaglandin  $G_2$  gebildet.

In der sich anschließenden Peroxidase-Reaktion erfolgt die Umwandlung in das Hydroxy-Endoperoxid Prostaglandin  $H_2$ ,

welches die Ausgangssubstanz zur Bildung von biologisch aktiven Prostaglandinen und Thromboxanen ist (Hinz et al., 1999).

**Abb. 05** Die bifunktionelle Rolle der Cyclooxygenase.

Gegenwärtig sind zwei Isoenzyme der Cyclooxygenase bekannt: Cyclooxygenase 1 (COX-1) und Cyclooxygenase 2 (COX-2). Es handelt sich bei den Isoenzymen um glykosilierte, integrale Membranproteine, die in der luminalen Oberfläche des endoplasmatischen Retikulums (ER) und in der inneren und äußeren Kernmembran lokalisiert werden konnten. Die COX-2-Isoform ist dabei vor allem in der Kernmembran zu finden (Smith et al., 2000).

Beide Cyclooxygenasen sind sowohl funktionell als auch strukturell gesehen Homodimere. Dabei besteht jedes Monomer aus 3 strukturellen Domänen:

- der Epidermal-Growth-Factor (EGF) Domäne am N-terminalen Ende (ca. 50 AS),
- der benachbarten Membran-bindenden Domäne (MBD) (ca. 50 AS)
- und der großen, globulären Katalytischen Domäne am C-terminalen Ende (ca. 460 AS).

Die COX-Isoenzyme interagieren mit der Membran durch das Eindringen der Membran-bindenden Domäne in nur eine Schicht der Lipiddoppelschicht. Sie werden daher als monotopische integrale Membranproteine bezeichnet (Garavito et al., 1999).

Diese monotopische Natur der Cyclooxygenasen hat funktionelle Bedeutung für die Substrat-Bindung. Die bifunktionellen Isoenzyme besitzen für die Katalyse der Cyclooxygenase- und Peroxidase-Reaktion 2 räumlich voneinander getrennte katalytische Zentren. Die Membran-bindende Domäne ist nicht nur für die Verankerung des Enzyms im Bilayer verantwortlich, sondern sie formt auch den Eingang des katalytischen Zentrums (aus 4  $\alpha$ -helicalen Regionen), in welchem die „Cyclooxygenase-Reaktion“ stattfindet. Diese sog. „COX-active-Site“ ist ein langer,

hydrophober Kanal mit wenigen polaren Resten. Die strukturellen Merkmale der MBD gestatten es der Arachidonsäure, dieses katalytische Zentrum direkt vom hydrophoben Teil der Lipiddoppelschicht aus zu erreichen. Das in der „COX-active-Site“ aus Arachidonsäure gebildete Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) wandert dann zum zweiten katalytischen Zentrum, der „Peroxidase-active-Site“. Diese ist auf der luminalen Seite des Enzyms lokalisiert. Erst hier findet dann die „Peroxidase-Reaktion“, d.h. die Reduktion von PGG<sub>2</sub> zu Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), statt (Garavito *et al.*, 1999).

Der von der Membran-bindenden Domäne gebildete, hydrophobe Kanal weist bei der COX-2 Isoform ein etwa 17 Prozent größeres Volumen auf. Direkt benachbart zu diesem Kanal ist ein zweiter Kanal, das sog. „Side pocket“. Dieser ist nur bei der COX-2 Isoform geöffnet. Bei der COX-1 wird er hingegen durch einen voluminösen Isoleucin-Rest (statt wie bei COX-2 durch einen Valin-Rest) verschlossen. Diese Unterschiede in der Größe der Substratbindungsstellen bewirken eine unterschiedliche Substratspezifität der beiden Isoenzyme. Während COX-1 spezifisch nur Arachidonsäure und Dihomo- $\gamma$ -Linolensäure umsetzt, wird durch COX-2 ein größeres Spektrum an Fettsäuren metabolisiert (zusätzlich Linolsäure,  $\alpha$ -/ $\gamma$ -Linolensäure und Eicosapentaensäure) (Hinz *et al.*, 1999). Dieser geringe Unterschied ermöglicht darüber hinaus die Entwicklung von Substanzen, die spezifisch nur die COX-2 inhibieren, und nicht die COX-1.

#### 1.4.2 Unterschiede in Lokalisation und Funktion der COX-Isoenzyme

Nicht nur in der subzellulären Lokalisation der Isoenzyme (Morita *et al.*, 1995), sondern auch in ihrer Verteilung im Organismus und vor allem in ihren biologischen Funktionen (Smith *et al.*, 1994) bestehen grundlegende Unterschiede.

Die von Miyamoto *et al.*, (1976) erstmals isolierte Cyclooxygenase 1 kommt konstitutiv in vielen Körpergeweben vor, z.B. in Niere, Magen, glatten Muskelzellen und Blutplättchen (Simmons *et al.*, 1992; O'Neill *et al.*, 1993). Sie ist dort basal nachweisbar und sorgt für die Bereitstellung des physiologischen Bedarfs an Prostanoiden. Diese dienen z.B. der Protektion der Magen-Darm-Schleimhaut (Prostazyklin; ist gastro- und mukosaprotektiv), der Regulation von Nierendurchblutung und glomerulärer Filtration (PGE<sub>2</sub>; ist nephroprotektiv) oder auch der Plättchenfunktion und Blutflußregulation (Thromboxan A<sub>2</sub>).

Die 1989 durch Simmons *et al.* entdeckte COX-2 wurde damals in erster Linie als induzierbares Enzym angesehen. Bei Entzündungsvorgängen können z.B. proinflammatorische Zytokine ( Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukin 2 (IL-2)), Endotoxine oder Mitogene (Wachstumsfaktoren) eine schnelle Induktion von COX-2 mRNA auslösen. Daraus resultiert dann eine überschießende Synthese von Prostaglandinen in den betroffenen Geweben. Die Cyclooxygenase 2 hat aufgrund dessen eine überragende Bedeutung für Entzündungsvorgänge und Prozesse der Zelldifferenzierung und Mitogenese (De Witt *et al.*, 1993). Mittlerweile ist bekannt, dass die COX-2 nicht nur induzierbar ist, sondern in einigen wenigen Organen wie Gehirn und Niere auch konstitutiv exprimiert wird (Feng *et al.*, 1993; Harris *et al.*, 1994).

#### 1.4.3 Lokalisation der Cyclooxygenase-Isoenzyme in der Niere

Hinsichtlich der Lokalisation der beiden Isoenzyme innerhalb der Niere existieren jedoch wichtige Unterschiede.

Basale Expression von COX-1	Basale Expression von COX-2
in Arterien, in Arteriolen, in Glomeruli, und in Sammelrohrzellen,  jedoch nicht im proximalen und distalen Tubulus, in der Henleschen Schleife, und in der Macula densa.	<u>im Nierencortex:</u> in Arteriolen in Podozyten der Glomeruli in Macula densa Zellen in TALH-Zellen  <u>im Nierenmark:</u> im Sammelrohr in den interstitiellen Zellen
Smith et al., 1978	Nantel et al., 1999; Komhoff et al., 1997; Vio et al., 1997; Harris et al., 1994

**Tab. 07** Expression der Cyclooxygenase-Isoenzyme in der Niere.

#### 1.4.4 Signaltransduktionswege zur Induktion der COX-2

Die Cyclooxygenase-Isoenzyme weisen sowohl innerhalb einer Spezies als auch zwischen unterschiedlichen Spezies eine große Homologie der Aminosäuresequenz (60-65 %) auf (*Smith et al., 1996*). Trotz großer Ähnlichkeit in Struktur und enzymatischer Funktion (*O'Bannon et al., 1992*) werden die Cyclooxygenase-Isoenzyme von unterschiedlichen Genen kodiert, die sich auf verschiedenen Chromosomen (COX-1: Chromosom 9; COX-2: Chromosom 1; *Williams et al., 1996*) befinden.

Das Gen für die COX-1 umfasst etwa 22 Kilobasepaare und enthält 11 Exons (*Kraemer et al., 1992*). Es enthält keine TATA-Box und ist ein in den meisten Geweben konstitutiv exprimiertes „Haushaltsgen“ (Strukturgen, das für ständig benötigte Proteine codiert), welches physiologische Adaptionen reguliert.

Das Gen der COX-2 ist aufgrund wesentlich kürzerer Introns nur 8 Kilobasenpaare lang und besitzt 10 Exons (*Kujubu et al., 1991*). Die schnelle Induktion der COX-2 (vergleichbar mit der Expression von c-fos) führt zur Klassifikation von COX-2 als „Immediate early Gene“.

Die Promotorregionen des COX-2 Gens von Mäusen, Ratten, Hühnern und auch die des Menschen konnten bereits kloniert werden. Unabhängig von der untersuchten Spezies enthalten alle diese Promotoren

- eine klassische TATA-Box,
- eine E-Box,
- und Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren,
  - wie CRE (cAMP Response Element),
  - NFkB,
  - NF-IL-6/CCAAT-Enhancer-Binding-Protein (NF-IL6/CEBP).

Diese Sequenzen haben nachweislich eine Funktion als positive regulatorische Elemente (cis-regulatorische Elemente) bei der Gentranskription der COX-2 in den unterschiedlichsten Zelltypen (*Iniguez et al., 2000*).

Durch Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren wie IL-1, TNF $\alpha$ , Lipopolysaccharid und Phorbol ester wird die Expression der COX-2 in Endothelzellen stimuliert (*Hernandez et al., 2001*). Eine induzierbare oder konstitutive Expression der COX-2 findet sich auch in spezialisierten Zellen und Geweben, in welchen COX-2 eine spezifische Funktion bei individuellen biologischen Prozessen spielt. Zu diesen Prozessen zählen z.B. Reproduktion, Immunabwehr, physiologische Vorgänge der Niere, Neurotransmission. Die hierbei an der Regulation der COX-2 Isoform beteiligten Faktoren sind sowohl für den jeweiligen Prozess als auch für das Gewebe spezifisch. Beispielsweise kann die Expression von COX-2 in den Granulosazellen durch das Follikel-stimulierende Hormon und das Luteinisierende Hormon induziert werden, während die Expression der COX-2 in der Niere von der luminalen Salzkonzentration abhängig ist (*Smith et al., 2000*).

Seit längerer Zeit ist bekannt, dass der NF $\kappa$ B- und der MAP-Kinase (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)-Mechanismus zu den Signalmechanismen gehören, die für eine Steigerung der COX-2 Expression verantwortlich sind (*Cheng et al., 2000; Hao et al., 2000; Yang et al., 2000*).

Eine in diesem Zusammenhang interessante und relativ neue Erkenntnis konnte bei der Untersuchung humaner T-Zellen gewonnen werden.

Die an der Aktivierung von T-Zellen beteiligten Signalmechanismen sind u.a. abhängig von Calcium und Proteinkinase C (PKC). Diese Mechanismen tragen entscheidend bei zur Induktion und Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B, AP-1 und dem Nukleären Faktor von aktivierten T-Zellen (NFAT), welche an der Regulation der Cytokin-Genexpression beteiligt sind. Sowohl der Vorgang der T-Zell-Aktivierung als auch die Transkription von Cytokin-Genen kann durch Hemmung der Proteinphosphatase Calcineurin unterbunden werden. Dies ist möglich mit Hilfe von Calcineurin-Inhibitoren, wie Cyclosporin A und Tacrolimus.

Bei Untersuchungen zur Regulation der COX-2 Genexpression in humanen T-Zellen hat sich nun gezeigt, dass es durch T-Zell-Aktivierung zu einer Induktion der COX-2 Promotoraktivität kommt. Dabei wurde entdeckt, dass die gesteigerte Aktivität des COX-2 Promotors durch Cyclosporin A (Calcineurin-Hemmung) gehemmt wird. Bei gesteigerter Expression einer katalytischen Untereinheit von Calcineurin war die COX-2 Transkription hingegen verstärkt. In den Positionen -117 (distale NFAT-Bindungsstelle) und -81 (proximale NFAT-Bindungsstelle), also bei 117 und 81 Basenpaaren flussaufwärts der Transkriptionsinitiationsstelle, konnten schließlich zwei NFAT-Bindungsstellen gefunden werden. Jede ist essentiell für die Induktion der COX-2 Expression in T-Zellen und befindet sich ebenfalls wie die TATA-Box, das CRE-Element, die E-Box und die Bindungsstelle für das NF-IL-6/CCAAT-Enhancer-Binding-Protein (NF-IL-6/CEBP) innerhalb der ersten 170 Basenpaare flussaufwärts vom Transkriptionsstart (*Iniguez et al., 2000*).

Für eine volle Aktivierung der Transkription des menschlichen COX-2 Gens sind beide NFAT-Bindungsstellen nötig. Das gleichzeitige Vorhandensein mehrerer NFAT-Bindungsstellen ist eine Gemeinsamkeit von COX-2 Promotor und anderen NFAT-abhängigen Promotoren. Dazu zählen u.a. die Promotoren von IL-2 und IL-4, von TNF $\alpha$  und von dem Granulozyten-Macrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (*Iniguez et al., 2000*).

Die von Iniguez et al. erzielten Ergebnisse legen nahe, dass der Cyclosporin A-sensitive Ca<sup>2+</sup>/Calcineurin/NFAT-Mechanismus und der Proteinkinase C (PKC)/AP-1-Mechanismus in die Regulation der COX-2 Expression in menschlichen T-Lymphozyten involviert ist.



## 1.5 Immunsuppression

### 1.5.1 Die T-Zellrezeptor-vermittelte Signaltransduktion

Die Immunantwort des Organismus wird durch zwei Klassen von Lymphozyten vermittelt:

- den im Knochenmark gebildeten und nach Aktivierung Antikörper-produzierenden B-Zellen
- und den aus dem Knochenmark stammenden aber im Thymus gereiften T-Zellen, die in Form von regulatorischen Helfer-T-Zellen und Suppressor-T-Zellen, sowie zytotoxischen T-Zellen für die zellvermittelte Immunität verantwortlich sind.

Bei einer Aktivierung des Immunsystems durch Fremdanigene (Alloantigene) oder Eigenantigene (Autoantigene) werden diese von phagozytierenden Zellen, z.B. Macrophagen oder Monozyten, aufgenommen, verändert und in der veränderten Form mit Hilfe des MHC-Komplexes (Major Histocompatibility Complex) an der Zelloberfläche präsentiert. Die aktivierten Macrophagen setzen daraufhin IL-1 frei und T-Helfer-Zellen erkennen mit Hilfe des T-Zellrezeptors sowohl das veränderte Antigen als auch Bestandteile des MHC-Komplexes der aktivierten phagozytierenden Zellen. Dabei sind auch die dem T-Zellrezeptor benachbarten CD3- und CD4- Zelldifferenzierungskomplexe an der Kontaktaufnahme von T-Helferzelle und MHC der phagozytierenden Zelle beteiligt. Folge der Interaktion ist die Synthese verschiedener Cytokine, v.a. der Interleukine 2, 4, 5 und 6 durch die T-Helferzelle.

Die T-Zell-Rezeptor (TCR)-vermittelte Signaltransduktion resultiert

- in der Aktivierung des *ras* Proteins (kleines GTP-bindendes Protein, beteiligt an der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren)
- und dem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration (*Ho et al., 1996*).

Diese beiden intrazellulären Second Messenger lösen dann Signalwege aus, die beteiligt sind an der Aktivierung einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NFAT, AP-1, NFkB, dem cAMP Response-Element bindenden Protein (CREB) und evtl. auch Mitgliedern der ATF (Aktivierende Transkriptionsfaktoren) Familie (*Durand et al., 1987; Shaw et al., 1988*). Der Sinn dieses Signalweges liegt in der Aktivierung von Cytokinen, Wachstumsfaktoren und Zell-Oberflächen-Proteinen, die dann die Immunantwort koordinieren.

### 1.5.2 Die Proteinphosphatase Calcineurin: Aktivierung, Struktur und Funktion

Der Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts beruht auf der T-Zell-Rezeptor-vermittelten Aktivierung der PLC- $\gamma$ , deren Folge eine gesteigerte Bildung von  $\text{IP}_3$  und DAG aus Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat ist. Die Interaktion von  $\text{IP}_3$  mit dem  $\text{IP}_3$ -Rezeptor führt zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Kompartimenten (*Clapham, 1995*). Die durch T-Zell-Aktivierung erreichten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen genügen zur Aktivierung der Calcium-Calmodulin-abhängigen Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin (*Fruman et al., 1992*).

Die Proteinphosphatase Calcineurin wurde erstmals von *Wang und Desai* 1976 als Calcium-bindendes Enzym in Zellextrakten des Rinderhirns entdeckt. Aufgrund der Lokalisation im Nervengewebe gaben die Entdecker der Substanz den Namen Calcineurin. Tatsächlich trägt es mit mehr als einem Prozent zum Gesamtprotein des Gehirns bei (*Klee et al., 1979*). Neben dem Nervensystem sind auch die glatte Muskulatur (*Fraser et al., 1995*) und die Nieren (*Tumlin et al., 1993*) besonders Calcineurin-reiche Gewebe. Nicht nur an der Signaltransduktion der T-Zelle, sondern auch an vielen anderen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen und mit Proteinphosphorylierung verbundenen Prozessen ist Calcineurin beteiligt. Dazu zählen z.B. die Neurotransmitterfreisetzung im Gehirn,

die Apoptose, die cardiale Hypertrophie und die Regulation der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  des distalen und proximalen Nephrons.

Es handelt sich bei Calcineurin um ein im Cytosol aller eukaryotischer Zellen vorkommendes Heterodimer, welches

- aus einer katalytischen und Calmodulin-bindenden Untereinheit („Calcineurin A“)
- und einer daran gebundenen regulatorischen  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Untereinheit („Calcineurin B“) besteht (Klee *et al.*, 1998).

Bei der A-Untereinheit konnten 3 ( $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2,  $\alpha$ -3), und bei der B-Untereinheit 2, sich in ihrer Organverteilung unterscheidenden, Isoenzyme ( $\beta$ -1,  $\beta$ -2) nachgewiesen werden.

Diese aus 2 Untereinheiten bestehende Struktur ist einzigartig unter den Proteinphosphatasen und essentiell für die Enzymaktivität. Die Calcium-Abhängigkeit der Phosphatase-Aktivität wird durch die beiden strukturell ähnlichen, aber funktionell unterschiedlichen,  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteine Calmodulin und Calcineurin B kontrolliert (Klee *et al.*, 1998). Die Calmodulin-bindende Domäne ist dabei auf der Calcineurin A-Untereinheit lokalisiert, benachbart zu einer autoinhibitorischen Domäne und dem C-terminalen Ende der A-Untereinheit (Wantanabe *et al.*, 1995). Zu einer Komplexbildung zwischen Calmodulin und den beiden Untereinheiten kommt es nur in Gegenwart von Calcium. Im inaktiven Zustand wird das katalytische Zentrum von Calcineurin durch die autoinhibitorische Domäne verschlossen. Erst bei steigenden Calcium-Konzentrationen wird die Aktivität von Calcineurin stimuliert durch die Bindung von Calcium an Calmodulin und an die B-Untereinheit. Dadurch kommt es zu einer allosterischen Modifikation der Tertiärstruktur. Die autoinhibitorische Domäne kann nun das katalytische Zentrum der A-Untereinheit nicht länger verschließen. Es folgt die Komplexierung von Calmodulin mit der A-Untereinheit. Die Affinität von Calmodulin zu Calcium wird dadurch verdoppelt. Die Konformationsänderungen bei Calmodulin und der A-Untereinheit bewirken, dass bereits micromolare Veränderungen in der Calcium-Konzentration eine bemerkenswerte Stimulation der Calcineurin-Aktivität bewirken (Stemmer *et al.*, 1994).

### 1.5.3 Der Transkriptionsfaktor NFAT

Das am besten charakterisierte Substrat von Calcineurin ist die Transkriptionsfaktoren-Familie NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) (Rao *et al.*, 1997). Der die Genexpression von Cytokinen induzierende, erstmals in T-Zellen nachgewiesene, Transkriptionsfaktor, spielt auch in einer Vielzahl von Zellen außerhalb des Immunsystems eine wichtige Rolle.

Anhand der vereinfachten Nomenklatur nach Hoey *et al.*, (Hoye *et al.*, 1995) kann man die NFAT-Familie in die Proteine NFAT1, NFAT2, NFAT 3 und NFAT4 einteilen. Diese existieren jeweils in mehreren Isoformen (ausgenommen NFAT-3) und variieren zwischen unterschiedlichen Spezies.

Entgegen ihres Namens werden die NFAT-Proteine nicht nur in T-Zellen sondern auch in anderen immunkompetenten Zellen und in Geweben außerhalb des Immunsystems exprimiert. Bei den bisher durchgeführten Untersuchungen zur Organverteilung von NFAT-mRNA und – Protein zeigte sich, dass sich die Ergebnisse abhängig vom Untersuchungslabor oft deutlich unterscheiden und Gen- und Proteinexpression nicht immer miteinander korrelieren. Übereinstimmend konnte jedoch festgestellt werden, dass NFAT1- und NFAT2 mRNA besonders stark im peripheren lymphoiden Gewebe (humane periphere Blutlymphozyten PBL, Milz) exprimiert werden. Für NFAT-4 wird eine wichtige Rolle in der Entwicklung von T-Zellen vermutet, da sehr hohe NFAT-4 mRNA Spiegel im Thymus nachgewiesen werden konnten. Die

mRNA Genexpression von NFAT3 ist verglichen mit der der anderen NFAT-Mitglieder im lymphoiden Gewebe nur sehr gering. Die NFAT3 mRNA wird stattdessen bevorzugt außerhalb des Immunsystems exprimiert, z.B. in Niere, Herz und Lunge, in der Placenta und den Ovarien und im Kolon (*Hoey et al., 1995*). Die zugehörige Proteinexpression wurde jedoch noch nicht untersucht.

An der Aktivierung der NFAT-Proteine sind

- Calcium-stimulierende Immunorezeptoren, wie z.B. die Antigen-Rezeptoren auf T- und B-Zellen und Immunorezeptoren auf Mastzellen, Macrophagen, Basophilen und Natürlichen Killerzellen,
- aber auch bestimmte heterotrimere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wie z.B. der Histamin-H1-Rezeptor, der Thrombin-Rezeptor und der muscarinische M3-Acetylcholin-Rezeptor, beteiligt.

Es konnten bislang 3 für die Aktivierung notwendige Schritte aufgezeigt werden:

- die Dephosphorylierung und damit verbundene Konformationsänderung der im Cytoplasma lokalisierten NFAT-Proteine durch aktiviertes Calcineurin,
- die Translokation des dephosphorylierten NFAT-Proteins in den Zellkern,
- und die gesteigerte Affinität des dephosphorylierten Proteins zur DNA.

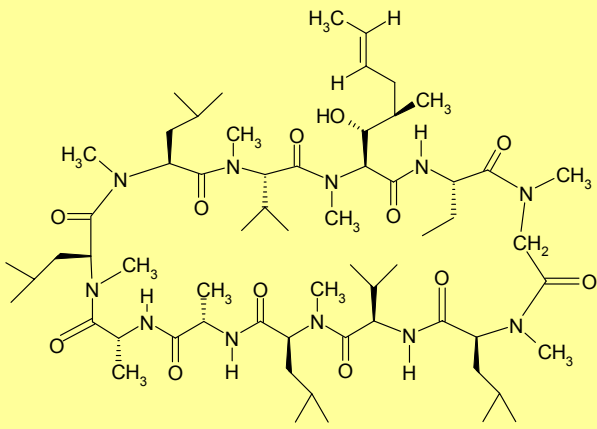
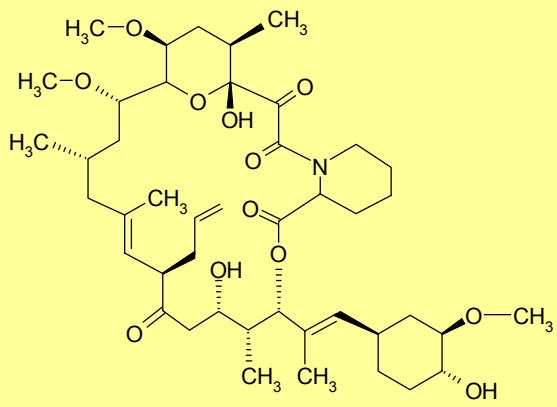
Bei einem Absinken der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration oder der Hemmung von Calcineurin, z.B. durch die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus, kommt es innerhalb von 5 bis 10 Minuten zur Rephosphorylierung des Proteins durch Kinasen, wie z.B. GSK-3 (*Graef et al., 2001*). Das phosphorylierte Protein kehrt dann ins Cytoplasma zurück, die Affinität zur DNA ist wieder gering (*Ruff et al., 1995; Loh et al., 1996*).

Die aus der Aktivierung von NFAT resultierende, wohlbekannte immunmodulatorische Wirkung beruht auf einer gesteigerten Expression von IL-2, -3, -4, -5, -8 und -13, GM-CSF,  $\text{INF}\gamma$  und  $\text{TNF}\alpha$  durch T-Zellen und in untergeordnetem Maß auch durch andere immunkompetente Zellen (*Rao et al., 1997*).

Neben der wichtigen Rolle in der Transkription von Cytokin-Genen und anderen für die Immunantwort kritischen Genen werden viele weitere Vorgänge von NFAT kontrolliert. Dazu zählen u.a. die Entwicklung des kardiovaskulären Systems, die Embryogenese und die Entwicklung von peripheren Gefäßen während der Angiogenese (*Rao et al., 1997*). Erst vor kurzem wurde entdeckt, dass NFAT auch eine Rolle bei der Regulation der Prostaglandin-Synthese spielt. Bei Stimulation primärer Epithelzellen mit VEGF (vascular endothelial growth factor) kommt es zur nukleären Translokation von NFAT. Im Zellkern bindet NFAT an spezielle NFAT-Bindungsstellen des Cyclooxygenase 2-Promotors und aktiviert die Transkription der Cyclooxygenase 2 (*Hernandez et al., 2001*).

### 1.5.4 Die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus

Als Substrate von Calcineurin, sind die NFAT-Proteine das eigentliche Hauptziel der Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus.

Calcineurin-Inhibitoren	
Cyclosporin A (CsA)	Tacrolimus (FK506)
<ul style="list-style-type: none"> <li>1973 als Stoffwechselprodukt aus einer Metabolitenmischung des Pilzstammes <i>Tolypocladium inflatum</i> isoliert</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1984 aus Kulturen der Pilzart <i>Streptomyces tsukubaensis</i> isoliertes Stoffwechselprodukt</li> </ul>
	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Macrozyclisches Polpeptid</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>erstes klinisch eingesetztes Immunsuppressivum mit Makrolid-Struktur: lipophiler, 21-gliedriger Lactonring</li> </ul>

**Tab. 08** Die chemische Struktur der Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus.

Trotz grundlegender Unterschiede in der chemischen Struktur beider Wirkstoffe sind die molekularen Wirkmechanismen ähnlich. Die Calcineurin-Inhibitoren binden unter Bildung binärer Komplexe (Friedman *et al.*, 1991; Liu, 1991) an ihre im Cytosol lokalisierten Bindungsproteine. Dabei handelt es sich um sog. Immunophiline: diese katalysieren die cis-trans-Umlagerungen von Peptidyl-Prolyl-Bindungen (sog. Rotamase-Aktivität) (Göthel *et al.*, 1999).

- CsA bindet an Cyclophilin A.  
Essentiell für die Bindung sind die Aminosäuren 1, 2, 10 und 11 des CsA-Moleküls
- Tacrolimus bindet hingegen an FK BP 12/12A, sog. FK-bindende Proteine.

Da in vivo jedoch nur ein geringer Prozentsatz der Immunophiline besetzt ist, spielt die Hemmung der Rotamase-Aktivität eine untergeordnete Rolle.

Die immunsuppressive Wirkung basiert hingegen auf der Hemmung des durch Calcium und Calmodulin aktivierten, cytosolischen Enzyms Calcineurin durch die binären Komplexe aus Wirkstoff und Immunophilin. Man vermutet, dass dies auf einer Interaktion zwischen Calcineurin und der von Immunsuppressivum und Immunophylin gebildeten gemeinsamen Oberfläche beruht

(Ivery, 1999). Die nukleäre Translokation des cytosolischen Transkriptionsfaktors NFAT (O'Keefe et al., 1992) und anderer Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NFkB und Oap (Oktameren-aktivierendes Protein) (Flanagan et al., 1991), wird dadurch unterbunden. Die T-Zellrezeptor-vermittelte Signaltransduktion wird gehemmt, da die Transkription der für die frühe Aktivierung der T-Zellen verantwortlichen Gene verhindert wird. So unterbleibt die Produktion von IL-2 (Hauptwirkung, resultierend aus NFAT-Hemmung), IL-3, -4, -5,  $\text{INF}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , GM-CSF und von Proto-Onkogenen, wie z.B. *c-myc* und *c-rel* (Plosker et al., 2000). Im Gegensatz zu Cyclosporin A ist Tacrolimus in vitro und in vivo in 10- bis 100-fach geringerer Konzentration wirksam und kann auch bei Abstoßungsreaktionen nach Gabe von Cyclosporin A noch wirksam sein.

Die Tatsache, dass durch Calcineurin-Hemmung die Translokation von NFAT nicht nur in Zellen des Immunsystems, sondern auch in anderen Zellen indirekt gehemmt wird (Horsley et al., 2002), wird auch als mögliche Ursache der durch Calcineurin-Inhibitoren induzierten Hypertonie und Nephrotoxizität (siehe Problemstellung, Punkt 2.2.1) diskutiert.

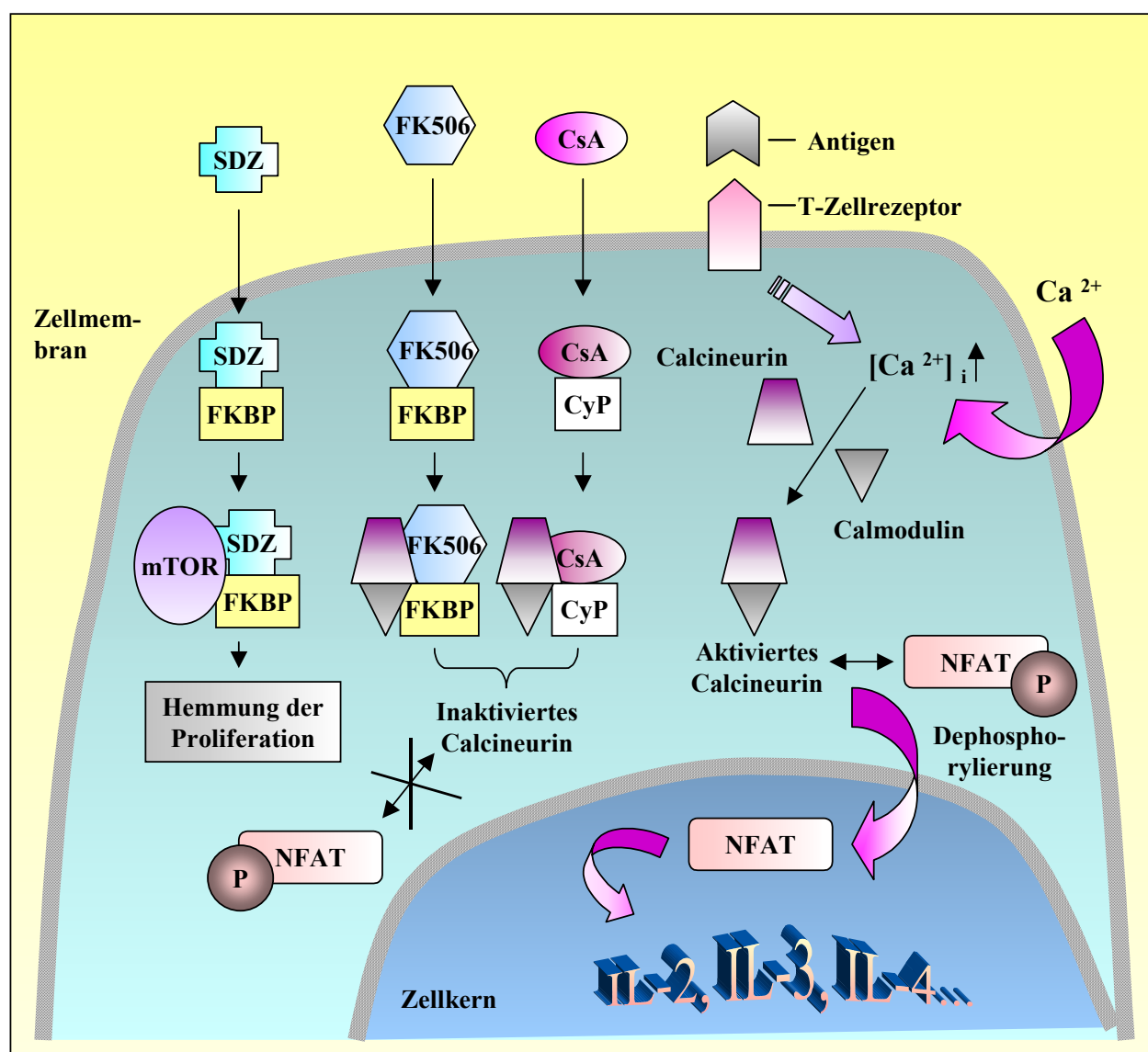
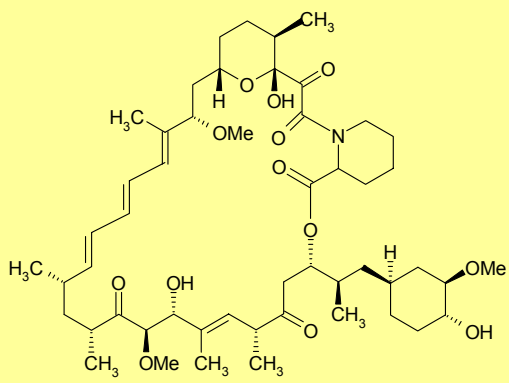
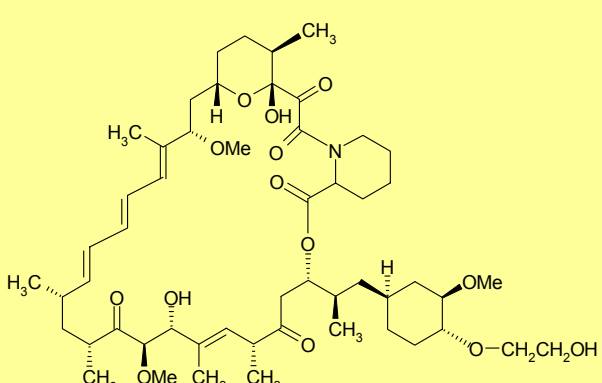


Abb. 06 Molekularer Wirkmechanismus von Calcineurin-Inhibitoren.

### 1.5.5 Die mTOR-Hemmer Rapamycin und SDZ-RAD

Zwei strukturell mit Tacrolimus verwandte Immunsuppressiva sind Rapamycin und sein Derivat SDZ-RAD. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit basiert der Wirkmechanismus dieser Substanzen nicht auf der Blockade der Cytokin-Transkription.

mTOR-Inhibitoren	
Rapamycin	SDZ-RAD
<ul style="list-style-type: none"> <li>1975 in einer Bodenprobe der Osterinsel Rapa Nui entdecktes Stoffwechselprodukt von <i>Streptomyces hygroscopicus</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>40-O-(2-Hydroxyethyl)-Rapamycin, kein Prodrug, im Körper keine Umwandlung zu Rapamycin (<i>Schuler et al., 1997</i>)</li> </ul>
	
<ul style="list-style-type: none"> <li>strukturell mit FK506 verwandte, macrozyklische Verbindung mit einem lipophilen, 31-gliedrigen Lactonring</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>hydrophiler als Rapamycin, nach oraler Gabe besser löslich und resorbierbar als Rapamycin, bei gleicher immunsuppressiver Wirksamkeit</li> </ul>

**Tab. 09** Die chemische Struktur der mTOR-Hemmer Rapamycin und SDZ-RAD.

Die Wirkung von Rapamycin (und SDZ-RAD) basiert auf dem selektiven Eingriff in die Proteinbiosynthese der T-Lymphozyten und der daraus resultierenden Hemmung ihrer Proliferation.

Wie auch Tacrolimus bindet der mTOR-Hemmer Rapamycin im Cytoplasma der T-Zelle an das Immunophilin FK BP 12. Im Unterschied zu Tacrolimus erfolgt jedoch anschließend nicht eine Interaktion des binären Komplexes mit Calcineurin, sondern - anhand der C7-Methoxy-Gruppe (*Luengo et al., 1995*) - die Bindung (*Van Duyne et al., 1991*) an die multifunktionelle Serin-Threonin-Kinase mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) (*Sabatini et al., 1994*).

#### Die Blockade von mTOR hemmt

- das costimulatorische Signal 2 zwischen der G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>-Transition
- und das Cytokinsignal 3 der späten G<sub>1</sub>-Phase.

Dabei stellt die G<sub>0</sub>-Phase die cytokinetische Ruhephase dar und die G<sub>1</sub>-Phase die präsynthetische Wachstumsphase, an die sich die S-(Synthese)-Phase und die G<sub>2</sub>-Phase (= postsynthetische Wachstumsphase) anschließen.

Durch die Unterbrechung der costimulatorischen Signal werden Transkriptionsfaktoren der NFκB-Familie gehemmt (*Lai et al., 1994*) und man vermutet auch eine Modulation der Aktivität der Proteinkinase C (*Kimball et al., 1993*).

Durch die Hemmung der späten G<sub>1</sub>-Phase blockieren mTOR-Hemmer die folgenden vier Cytokin-gesteuerten Signalwege und deren proliferative Signale:

- den zur Aktivierung von Cyclin führenden Abbau von p27<sup>kip1</sup>,
- die Stimulation der p70<sup>S6</sup>-Kinase, die ein notwendiger Schritt in der Synthese endosomaler Strukturproteine ist,
- die zu einer Steigerung der ribosomalen Proteinsynthese führende Freisetzung des „Elongation-factor 4A“ aus der Bindung an PHAS-I
- und die transkriptionelle Up-Regulation der anti-apoptotischen Proteine bcl und p21Ras (*Kahan und Camardo, 2001*).

Es ist diesbezüglich nachgewiesen, dass Rapamycin die Wachstumsfaktor-abhängige Proliferation generell in allen bislang getesteten hämatopoetischen und auch nicht-hämatopoetischen Zellen, einschließlich glatter Gefäßmuskelzellen, hemmt (*Schuler et al., 1997*).

Sowohl die therapeutischen als auch die toxischen Effekte von Rapamycin (und SDZ-RAD) basieren auf diesen zellulären Veränderungen. Im Gegensatz zu den Calcineurin-Inhibitoren kommt es unter mTOR-Hemmung seltener zu Hypertonie und nephrotoxischen Wirkungen. Verglichen mit Rapamycin scheint SDZ-RAD eine noch geringere Nebenwirkungsrate zu haben.

## 2 Problemstellung

### 2.1 Die primäre, genetisch bedingte Hypertonie

#### 2.1.1 Die spontan hypertensive Ratte als Modell der primären Hypertonie

Sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte finden die Entwicklung der Hypertonie und die daraus resultierenden Komplikationen in charakteristischen ontogenetischen Phasen statt. Die menschliche Hypertonie ist aber wegen substantieller individueller Unterschiede in der polygenetischen Disposition und in excitatorischen Umwelt-Faktoren schwer zu untersuchen, da hierdurch viele Variationen der das kardiovaskuläre System beeinflussenden direkten und indirekten Effekte entstehen.

Spontan hypertensive Ratten (SHR) haben hingegen innerhalb einer Kolonie die gleiche polygenetische Disposition und die gleichen excitatorischen Faktoren. Hieraus ergeben sich uniforme Veränderungen in den direkten und indirekten Effekten auf das kardiovaskuläre System (*Doggrell et al., 1998*). Das Fehlen inter-individueller Unterschiede ist ein Hauptvorteil der SH-Ratte (*Lindpaintner et al., 1992*). Ein weiterer Vorteil ist die Tatsache, dass die Entwicklung der Hypertonie wie beim Menschen charakterisiert ist durch eine prähypertensive, eine sich entwickelnde und eine stark hypertensive Phase, wovon jede für sich mindestens einige Wochen besteht. Der Unterschied zum Menschen besteht darin, dass die SHR den Bluthochdruck reproduzierbar schon im jungen Erwachsenenalter entwickeln und nicht wie der Mensch i.d.R. erst im mittleren Alter (*Folkow, 1993*).

Das detaillierte Wissen über unzählige entwicklungsphysiologische Aspekte der Anfang 1960 von Okamoto und Aoki gezüchteten SH-Ratte, und die Möglichkeit, den hypertensiven Prozess durch spezifische Interventionen in bestimmten Stadien der Ontogenese zu induzieren oder zu verhindern, machen diese Tierart somit zu einem gebräuchlichen Werkzeug der Hypertonieforschung. Es konnten bislang in diesem Modell nicht nur eine Vielzahl an kardiovaskulären Abnormalitäten identifiziert werden, sondern außerdem der Grad der genetischen Determination ermittelt werden, die zugehörigen ontogenetischen Aspekte im Detail studiert werden und deren Rolle in der Pathogenese der Hypertonie mit Hilfe einer Vielzahl an Interventionen bewertet werden. Es basieren daher mittlerweile mehr als 90% des Wissens über genetische Hypertonie auf Resultaten, die anhand der SH-Ratte gewonnen wurden (*Zicha et al., 1999*).

Dennoch zeigen sich auch bei diesem Modell in vielen Punkten unterschiedliche und kontroverse Ergebnisse bezüglich einer Vielzahl von Hypertonie-relevanten Faktoren, wie z.B. des Renin-Angiotensin-Systems. So ist einerseits die Bedeutung des Renin-Gens, und die wichtige Rolle von Mutationen in den regulatorischen Bereichen dieses Gens, für die bei SHR einsetzende Hypertonie bekannt. Andererseits jedoch wurde einigen der auf molekularer und zellulärer Ebene an der Regulation der renalen Renin-Synthese und -Sekretion beteiligten Faktoren bisher nur mangelhafte Aufmerksamkeit zuteil. Dazu zählen beispielsweise Prostaglandin E<sub>2</sub>, Stickstoffmonoxid und Katecholamine.

#### 2.1.2 Untersuchungen zur Frühphase der primären, genetisch bedingten Hypertonie

Die Bedeutung der Niere für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der genetisch bedingten Hypertonie ist offensichtlich (siehe Einleitung Punkt 1.2.1). Anhand renaler Cross-Transplantationen zwischen normo- und hypertensiven Rattenstämmen konnte gezeigt werden, dass die genetische Prädisposition zur Hypertonie mit der Donor-Niere auf den Empfänger



übertragen werden kann. Dies wurde nicht nur bei adulten Tieren mit etabliertem Bluthochdruck nachgewiesen, sondern auch bei jungen, prähypertensiven Tieren (*Dahl et al., 1975; Rettig et al., 1991; Rettig et al., 1993*).

Im Hinblick auf die besondere Bedeutung der Niere für die primäre Hypertonie lag der Schwerpunkt im ersten Teil der Dissertation auf der Untersuchung des Renin-Angiotensin-Systems sowie der renalen Gen- und Proteinexpression von Cyclooxygenase 1 und -2, und endothelialer und neuronaler NO-Synthase bei 3 und 7 Wochen alten SH-Ratten. Des Weiteren wurde bei den 7 Wochen alten, bereits hypertensiven SHR die Organverteilung der genannten Cyclooxygenase- und NO-Synthase-Isoenzyme untersucht. Das gewählte Alter der SHR entsprach dabei der Frühphase der Hypertonieentwicklung. Als normotensive Kontrolle wurden gleichaltrige WKY-Ratten verwendet.

## 2.2 Die sekundäre, Immunsuppressiva-induzierte Hypertonie

### 2.2.1 Hypertonie und Nephrotoxizität als Nebenwirkungen der Calcineurin-Hemmung

Ohne den therapeutischen Einsatz von Immunsuppressiva, v.a. der Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506), wäre eine Transplantationschirurgie in dem zur Zeit üblichen Ausmaß nicht denkbar. Während diese modernen Immunsuppressiva einerseits eine erfolgreiche Organtransplantation bei Patienten mit Herz-, Nieren- oder Leberinsuffizienz ermöglichen (Faulds et al., 1993; Mc Diarmid et al., 1995), beinhaltet ihr pharmakologisches Wirkungsspektrum andererseits neben der selektiven immunsuppressiven Wirkung auf T-Lymphocyten auch eine Vielzahl unerwünschter Nebenwirkungen. Von besonders großer Relevanz sind hier die, sowohl unter Cyclosporin A- als auch unter Tacrolimus-Therapie mit großen Schwankungen auftretende, Hypertonie und Nephrotoxizität (Bennett, 1995) (Tab. 10). Blutdruckerhöhungen konnten dabei sowohl mit als auch ohne eine nachweisbare renale Dysfunktion beobachtet werden (Goldbaekdal et al., 1996; Sturrock et al., 1993).

Nebenwirkungen	Tacrolimus Inzidenz[%]	Cyclosporin A Inzidenz[%]
<b>Hypertonie</b>	<b>28</b> [Textor et al., 1993] <b>27-33</b> [Fung et al., 1991]	<b>78</b> [Textor et al., 1993] <b>40-60</b> [Fung et al., 1991]
<b>Nephrotoxizität</b>	<b>18,0 - 42,6</b> [Platz et al., 1994]	<b>18,3 – 38,3</b> [Platz et al., 1994]

**Tab. 10** Inzidenz der Hypertonie und Nephrotoxizität bei Immunsuppression mit Calcineurin-Inhibitoren.

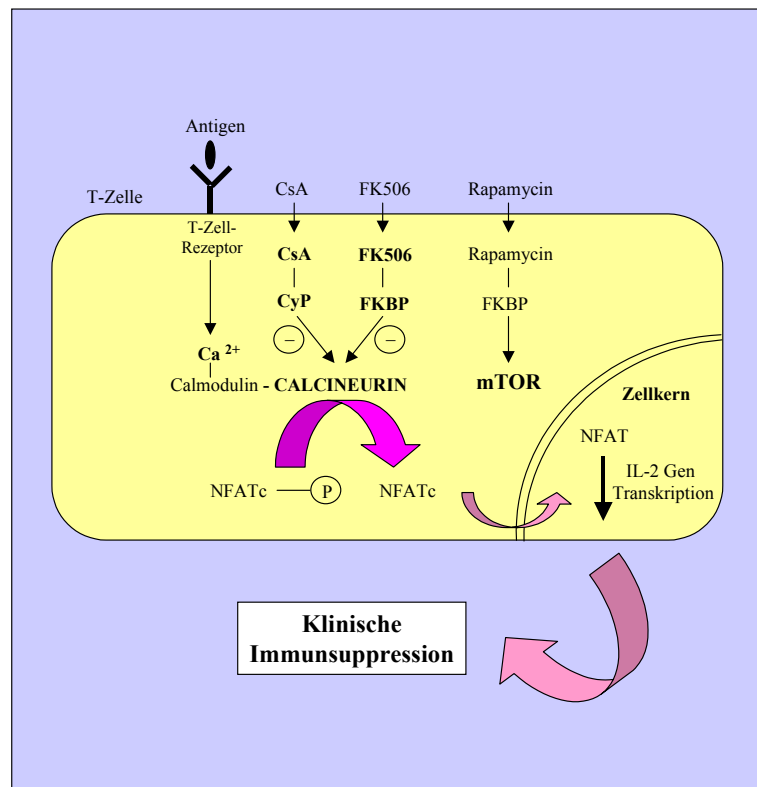
Obwohl sich Tacrolimus und Cyclosporin A sowohl in ihrer Struktur (FK506: Makrolid; CsA: Cyclisches Polypeptid) als auch in ihren Bindungsproteinen (CsA: Cyclophilin A; FK506: FKBP) unterscheiden, scheinen viele ihrer immunologischen und intrazellulären Wirkungen nahezu identisch zu sein (Takeda et al., 1999) (Abb. 7). Dies legte die Vermutung nahe, dass die Calcineurin-Hemmung von grundlegender Bedeutung für die Auslösung und Aufrechterhaltung der Hypertonie und für die akute und chronische Schädigung der Niere ist (Textor et al., 2000).

Die durch Calcineurin-Inhibitoren verursachte Störung der endothelialen Kontrolle des Gefäßtonus ist in diesem Zusammenhang von großer Relevanz. Mehrere Studien haben gezeigt, dass Cyclosporin A den systemischen (Textor et al., 1993), renalen (Radermacher et al., 1998) und koronaren (Epstein et al., 1998) Gefäßwiderstand steigert. Unter FK506 kommt es ebenfalls zu einer Steigerung des Gefäßwiderstandes, jedoch in geringerem Maß als bei CsA (Textor et al., 1993; Epstein et al., 1998). Daher plädieren einige Forscher dafür, dass Immunsuppression und vaskuläre Effekte untrennbar miteinander verbunden sind und intrinsische Eigenschaften der Calcineurin-Hemmung widerspiegeln (Sander et al., 1995). Die meisten dieser Effekte schließen sich dabei wechselseitig nicht aus, sondern können sich gegenseitig sogar noch verstärken.

So wurde von Kirk et al. bereits 1997 die Hemmung der Phosphatase Calcineurin als Ursache der Hypertonie postuliert (Abb. 8). Folge dieser Inhibition ist u.a. die Induktion des Transforming Growth Factor beta (TGF $\beta$ ) mit resultierender arterieller Vasokonstriktion (Kirk et al., 1997).

Die Calcineurin-Hemmung scheint auch an der durch CsA und FK506 verursachten renalen Vasokonstriktion beteiligt zu sein (Sander *et al.*, 1996). Diese betrifft bevorzugt die afferenten renalen Arteriolen (Lanese *et al.*, 1993; Thomson *et al.*, 1998).

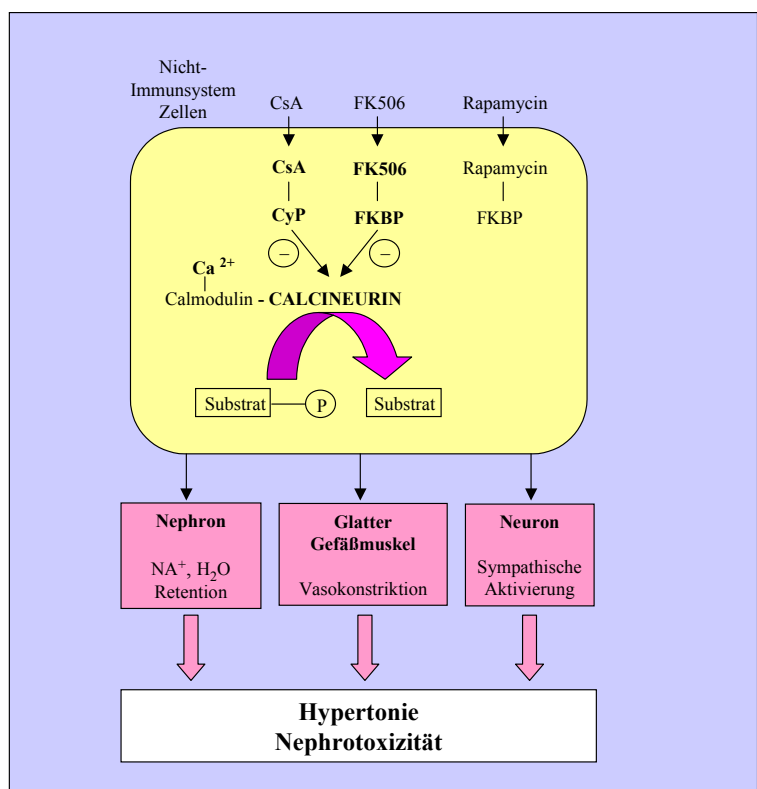
Es konnte in Versuchen mit Hunden, Ratten und Mäusen beobachtet werden, dass sich die durch CsA und FK506 verursachte Verschlechterung der Nierenfunktion parallel zur Calcineurin-abhängigen Immunsuppression verhielt (Sigal *et al.*, 1991; Dumont *et al.*, 1992; Su *et al.*, 1995). Der nicht mit Calcineurin interagierende mTOR-Hemmer Rapamycin hatte in diesen Modellen keinen Einfluss.



**Abb. 07** Calcineurin in der T-Zelle. Abkürzungen: NFAT, Nucleärer Faktor aktivierter T-Zellen; NFATc, Katalytische Untereinheit von NFAT; CyP, Cyclophilin; FKBP, FK506 bindendes Protein; mTOR, Mamalian Target of Rapamycin; IL-2, Interleukin 2; Nach Sander *et al.*, 1996.

Weitere hiermit übereinstimmende Ergebnisse konnten Zhang *et al.* im Jahr 2000 aufzeigen. Während die akute Infusion von CsA und FK506 einen Anstieg des Blutdrucks und der Aktivität renaler sympathischer Nerven verursachte, konnte der zu FK506 strukturanaloge mTOR-Hemmer Rapamycin während 1- und 2-stündiger Infusion keine der beiden Größen beeinflussen.

Dies spricht dafür, dass die durch Calcineurin-Inhibitoren verursachte Hypertonie und Nephrotoxizität (Andoh *et al.*, 1996) unweigerlich mit der Calcineurin-Hemmung im extralymphoiden Gewebe verbunden ist (Sander *et al.*, 1996; Lyson *et al.*, 1993).



**Abb. 08** Calcineurin-Hemmung in nicht immunkompetenten Zellen. Nach Sander *et al.*, 1996.

### **2.2.2 Untersuchungen zur Frühphase der sekundären, Immunsuppressiva-induzierten Hypertonie: Calcineurin-Inhibitoren und mTOR-Hemmer**

Die auf zellulärer und molekularer Ebene aus der Calcineurin-Hemmung resultierenden Veränderungen, besonders in Herz und Niere, sind zum jetzigen Zeitpunkt größtenteils ungeklärt. Es wird jedoch verstärkt nahegelegt, dass die Hemmung dieser ubiquitär vorkommenden Proteinphosphatase von großer Relevanz für die vielfältigen Nebenwirkungen der Calcineurin-Inhibitoren ist. Der Schwerpunkt der Dissertation lag deshalb auf der Untersuchung der durch die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus verursachten kardiovaskulären und renalen Veränderungen. Wie bei den Untersuchungen zur primären Hypertonie galt das Interesse auch hier der Frühphase der durch Immunsuppressiva induzierten Hypertonie.

Es ist seit längerer Zeit bekannt, dass Calcineurin-Hemmung die Dephosphorylierung des cytoplasmatischen Transkriptionsfaktors NFAT und damit dessen Translokation in den Zellkern, sowie die darauf folgende Bindung an den IL-2 Promotor und an andere Cytokin-Genpromotoren verhindert (siehe 1.5.3 und 1.5.4). Neuere Untersuchungen konnten jetzt zeigen, dass auch der Cyclooxygenase 2-Promotor spezielle NFAT-Bindungsstellen besitzt und die Bindung von NFAT die Transkription der Cyclooxygenase 2 aktiviert (*Hernandez et al., 2001*) (siehe 1.4.4). Da die Niere das COX-2 Isoenzym konstitutiv exprimiert, stand die Wirkung der Calcineurin-Inhibitoren auf die renale COX-2 Expression im Mittelpunkt des Interesses.

Um beurteilen zu können, ob die mit der systemischen Calcineurin-Hemmung verbundenen Veränderungen spezifisch sind, war neben den unbehandelten Kontrolltieren eine zweite Kontrollgruppe nötig. Da die Wirkung des Rapamycin-Derivats SDZ-RAD (40-O-(2-Hydroxyethyl)-Rapamycin) durch Calcineurin-unabhängige Signalmechanismen vermittelt wird (siehe 1.5.5), war es hierfür hervorragend geeignet und wurde alternativ zu dem in diesem Zusammenhang häufig eingesetzten Rapamycin (*Ryffel et al., 1994; Boluyt et al., 1997*) verwendet.

### 3 Materialien

#### 3.1 Versuchstiere

Für die experimentellen Tierversuche wurden ca. 3, 6 und 7 Wochen alte, männliche Albinoratten der Firma Charles River, Sulzfeld verwendet. Serologische, bakteriologische und parasitologische Parameter waren bei allen Tieren als einwandfrei nachgewiesen.

##### 3.1.1 Normotensive Wistar-Kyoto-Ratte (WKY)

Der Wistar-Stamm wurde Anfang des letzten Jahrhunderts durch H. H. Donaldson im Wistar-Institut (USA) selektioniert und als Inzuchtstamm weitergeführt. Nach Hysterektomie 1974 in den Charles River Laboratories (USA) kamen die, als zierlich und ruhig zu beschreibenden, Tiere zur Charles River GmbH (Sulzfeld).

##### 3.1.2 Spontan hypertensive Ratte (SH-Ratte, SHR)

Die SH-Ratte wurde 1963 in Kyoto (Japan) aus dem Wistar-Kyoto-Stamm auf Hypertonie selektioniert. Sie entwickelt ab der vierten Lebenswoche einen mit fortschreitendem Alter zunehmenden, genetisch bedingten Bluthochdruck. Aufgrund der genetischen Verwandtschaft ist es gestattet, normotensive WKY-Ratten mit hypertensiven SH-Ratten zu vergleichen.

#### 3.2 Chemikalien und Pharmaka

##### 3.2.1 Chemikalien

1,1,1 Trichloressigsäure	Fa. Rotiphorese
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris)	Boehringer, Mannheim
2-Mercaptoethanol	E. Merck, Darmstadt
3,4-Dihydroxy-benzylaminhydrobromid (DBA)	Fa. Sigma, Deisenhofen
Acetonitril zur Chromatographie	J.T. Baker B.V., Deventer, Holland
Acrylamid	Fa. Sigma, Deisenhofen
Aktiviertes Aluminiumoxid	Woelm Pharma GmbH, Eschwege
Aluminiumperoxydisulfat (APS)	Fa. Sigma, Deisenhofen
Biurett Reagenz	Fa. Sigma, Deisenhofen
Calciumchlorid –Dihydrat	E. Merck, Darmstadt
Carbogen Gas	Linde AG, Höllriegelskreuth
Chloroform p.a.	E. Merck, Darmstadt
Propylenglykolum	BUFA, Niederlande
D-(+)-Glucose-Monohydrat	E. Merck, Darmstadt
ECL RPN 2106	Fa. Sigma, Deisenhofen
Ethanol 99,8 % (Rotipuran)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA, Titriplex II)	E. Merck, Darmstadt
Ethylenglycol-Bisaminoethylether Tetraessigsäure (=EGTA)	E. Merck, Darmstadt
Glücksklee Magermilchpulver	Fa. Sigma, Deisenhofen
Glycin	Fa. Amersham
Gummi Arabicum Ph.Europ.1997	Caesar & Lorenz, Hilden
Hyperfilm ECL	Fa. Fluka
Isopropanol	E. Merck, Darmstadt
Isotonische Kochsalzlösung	B. Braun, Melsungen
Kaliumchlorid	E. Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	E. Merck, Darmstadt

L(+)-Ascorbinsäure	E. Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat Heptahydrat	E. Merck, Darmstadt
Methanol zur Chromatographie	J.T.Baker B.V., Deventer, Holland
Methylcellulose	Caesar & Lorenz, Hilden
Methylenblau	Fa. Amersham
Mikroprotein 690A (Lowry)	Fa. Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	E. Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	E. Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	E. Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	E. Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	E. Merck, Darmstadt
Natriumoctansulfonat	E. Merck, Darmstadt
Phenol p.a.	E. Merck, Darmstadt
Phosphorsäure p.a.	E. Merck, Darmstadt
Phthaldialdehyd	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Polysorbat 80/20 (Tween 80; Tween 20)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Sarcosyl (Natrium-N-Lauroylsarcosin)	Fa. Rotiphorese
Sequenzgel Puffer Konzentrat Rotiphorese®	Fa. Merck
Sequenziergel Rotiphorese®	Fa. Amersham
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Fa. Sigma
N,N,N',N'-Tetraethyldiamin (TEMED)	Fa. Sigma
Zinksulfat in Methanol/Ethylenglykol	E. Merck, Darmstadt

Alma Versuchstierfutter

Fa. Alma Botzenhard, Kempten

Zusammensetzung: Getreide; Erzeugnisse und Nebenerzeugnisse aus der Verarbeitung von Ölsaaten; Fischerzeugnisse; Erzeugnisse und Nebenerzeugnisse der Zuckergewinnung; Öle und Fette; Milcherzeugnisse; Bierhefe; Zusatzstoffe-Vormischung.

Gehalt an Inhaltsstoffen: 24% Rohproteine; 1,5% Lysin; 0,5% Methionin; 4,0% Rohfett; 5,0% Rohfaser; 7,0% Rohasche; 1,0% Calcium; 0,8% Phosphor; 0,5% Natrium; 0,25% Magnesium;

Zusatzstoffe pro kg Mischfutter: 25 000 I.E. Vitamin A; 1000 I.E. Vitamin D; 250 mg Vitamin E (Alpha Tocopherolacetat); 100 mg Vitamin C.

Niedrigsalz-Versuchstierfutter mit 0,02% (wt/wt) NaCl; Ssniff Special Diets, Soest

### 3.2.2 Pharmaka

Cyclosporin A: Sandimmun® Optoral, 100mg/Kapsel, N3	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg
Isotone NaCl Lösung 0,9% 100ml	Fa. Braun, Melsungen
Ramipril	Astra Zeneca, Mölndal, Schweden
SDZ-RAD: Tabletten, 1mg/Tablette	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg
Sevorane® (Sevofluran) Liq. 250ml	Fa. Abbott, Wiesbaden
(Fluoromethyl-2,2,2-trifluoro-1-(trifluoro)-ethyl ether)	(Inhalationsnarkotikum)
Tacrolimus: Konzentrat zur Infusion, 10mg/ml, 1ml pro Ampulle	Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka

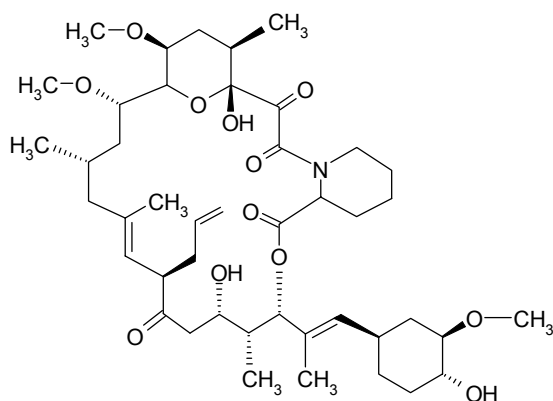
### 3.3 Lösungen und Suspensionen der applizierten Arzneistoffe

Cyclosporin A	15 mg/kg/Tag	1 Kapsel in 33,333 ml isotoner NaCl Lösung 0,9% unter leichter Wärme auflösen. Konzentration der Lösung: 3 mg/ml; Orale Applikation per Schlundsonde.
Tacrolimus (FK506)	5 mg/kg/Tag	1 ml Konzentrat zur Infusion mit 9 ml isotoner NaCl Lösung 0,9% ad 10ml; Konzentration der Lösung: 1mg/ml; Orale Applikation per Schlundsonde.

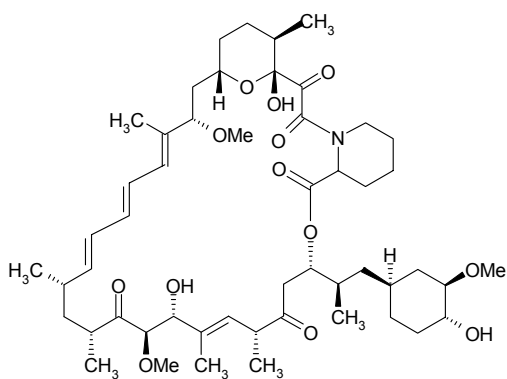
SDZ-RAD	1 mg/kg/Tag	100 mg Gummi Arabicum im Mörser mit 3 ml isotoner NaCl Lösung 0,9% gründlich vermischen und quellen lassen. Dann 2 Tabletten zugeben und homogenisieren. Portionsweise noch 7 ml isotoner NaCl Lösung 0,9% einrühren. Konzentration der Suspension: 0,2 mg/ml; Orale Applikation per Schlundsonde.
Ramipril	10 mg/kg/Tag	84 mg Ramipril in 50 ml Wasser. Über Nacht unter Ultraschall im Wasserbad lösen. Mit Wasser auf 700 ml auffüllen. Lichtschutz mittels Alufolie. Konzentration der Lösung: 0,12 mg/ml; Wirkstoff ist im Trinkwasser gelöst.

### 3.4 Strukturformeln der applizierten Arzneistoffe

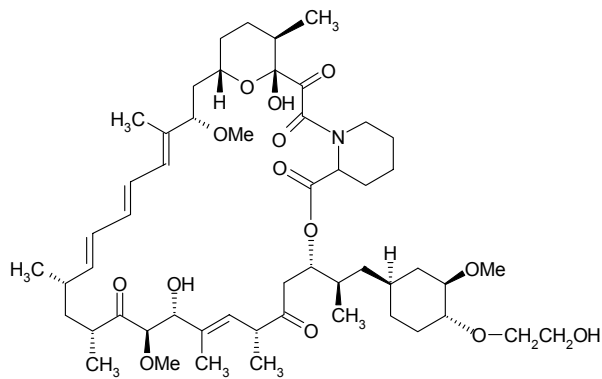
#### Tacrolimus

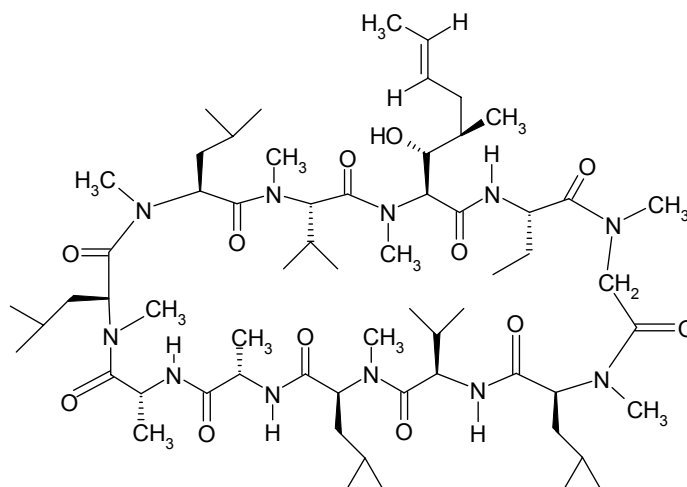
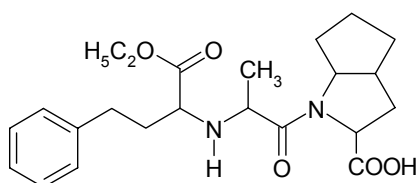


#### Rapamycin



#### SDZ-RAD



**Cyclosporin A****Ramipril****3.5 Geräte**

Absaugtopf  
 Analysenwagen  
 Analysenwagen  
 Autoklav  
 Blutdruckmeßgerät  
 (plethysmographisch)  
 Blutdruckmeßeinheit  
 (invasiv)  
 -Druckaufnehmer  
 - Signalwandler  
 - Recorder / Schreiber  
 Druckeichgerät

Typ H 51-Handy  
 Typ 1202 MP  
 KSG 112  
 BP Recorder 8005  
  
 Statham P23 Db  
  
 Transducer Mo.Nr.13-6615-50  
 Gould WindoGraf

Macheryl-Nagel, Düren  
 Sartorius, Göttingen  
 Sartorius, Göttingen

W+W Electronics, Basel, Schweiz

Gould-Statham, Hato Rey, Puerto Rico  
 Gould Inc., Rockside, Ohio  
 Gould Inc., Rockside, Ohio

Rhema Labortechnik, Hofheim/Ts.

**Einmalartikel**

Auslaufpipetten 1ml, 5ml, 10ml  
 Eppendorf Cups 1,5 und 2 ml  
 Falcon Tubes 50 ml  
 Monovetten 10 ml für Serum  
 PPN-Röhrchen, 4,5 und 14 ml

Sarstedt, Nümbrecht  
 Sarstedt, Nümbrecht  
 Sarstedt, Nümbrecht  
 Sarstedt, Nümbrecht  
 Greiner, Nürtingen



Serologische Pipetten 10ml/25 ml  
Pipettenspitzen

Sarstedt, Nümbrecht  
Abimed, Düsseldorf

Gamma-Counter  
Gel-Elektrophorese  
Gel-Trockner  
Heißluftschüttler  
Heizblock  
Homogenisatoren  
Homogenisatoren

Compugamma CS 1282  
Model S2 Sequenzing Gel  
Model 583 Gel Dryer  
Innova 4000  
Thermomix 5436  
Ultra Turax, Typ 18-10  
Branson Sonifier B15Cell Disruptor

LKB, Freiburg  
Fa. Gibco BRL Life Technologies  
Fa. Bio Rad  
New Brunswick Scientific  
Fa. Eppendorf  
Janke und Kunkel, Breisgau  
Heinemann, Schwäbisch Gmünd

### HPLC-Geräte

Autosampler  
Dämpfer  
Detektor  
Drucker  
Integrator

WISP 710A  
Bourdonrohr 80 cm  
M 460  
NEC Pinwriter P6 plus  
Gynkosoftware Chromatography Data  
System, Version 3.12  
M 490  
Nova-Pak C18; 3.9x150mm  
CTO-2A

Waters, Eschborn  
Waters, Eschborn  
Waters, Eschborn  
NEC Deutschland GmbH, München  
GynkoteK, Germering  
  
Waters, Eschborn  
Waters, Eschborn  
Shimadzu, Duisburg

Imager  
Kältetruhen  
Kältetruhen  
Kühlschrank  
Magnetrührer  
Mikroskop  
Narkosegerät  
Ölpumpe  
Operationsbesteck  
PH-Meter  
Photometer  
Photometer  
Power Supply  
Reflotron Diagnostic  
Schlundsonde  
Schüttelwasserbad  
Szintillationszähler  
Vakuumzentrifuge  
Vortexgeräte  
Wasseraufbereitungsanlage  
Wasserbad

Instant Imager  
Revco Ultima 1090-5VUB  
Privileg 031.342 8  
FKS 3600  
MR 3001  
CK2  
Trajan 808 mit Vapor 19,3  
Typ B5/2208  
Pinzetten, Scheren, Skalpelle  
Digital pH-Meter  
Novaspec 4049  
UV-120-02  
EPS 3500  
  
Animal Feeding Needle, 75x 1,5mm  
Typ CS 20  
Tri Carb 1500  
Univapo 150 H  
Model G540 E  
Milli-Q Water Purification System  
Model W13

Packard  
W.-Pabisch, München  
Quelle, Fürth  
Fa. Liebherr, Ochsenhausen  
Heidolph  
Olympus, Hamburg  
Fa. Drägerwerk Ag, Lübeck  
Edwards  
Martin Medizin-Technik, Tuttlingen  
Knick  
Shimadzu, Düsseldorf  
LKB, Freiburg  
Fa. Pharmacia  
Fa. Boehringer, Mannheim  
TSE, Kronberg/Ts.  
MGW Lauda  
Packard  
Uniequix  
Fa. Bender & Hobein Genie 2  
Waters, Eschborn  
Hanke

### Western-Blot Equipment

Biorad Power Pac 2000  
Filterpapier  
Nitrocellulosemembran (0,2Micron)  
Schüttler  
Mini Protean II System

Komplett Set

Fa. Biorad  
Fa. Biorad  
Fa. Biorad  
Bühler  
Fa. Biorad

Zentrifuge  
Zentrifuge  
Zentrifuge

Minifuge II Typ 4123  
Centrifuge 5403  
Biofuge B

Heraeus Christ, Osterode  
Fa. Eppendorf  
Heraeus Christ, Osterode

### 3.6 Kommerzielle analytische Tests

Zur analytischen Bestimmung der entsprechenden Parameter fanden folgende, im Handel befindliche, Tests Verwendung:

#### **Plasmaaldosteron-Konzentration (PAC)**

Die PAC wurde ebenso mit Hilfe eines Radioimmunoassays der Firma DiaSorin, Düsseldorf gemäß Anleitung ermittelt. Der Assay basiert auf der Konkurrenz von radioaktiv markiertem Aldosteron ( $I^{125}$ ) mit in der Probe (200  $\mu$ l) oder im Standard enthaltenem Aldosteron um eine limitierte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen. Nach Inkubation ist die Menge des gebundenen markierten Aldosterons umgekehrt proportional der Menge an unmarkiertem Aldosteron in der Probe.

#### **Plasma renin-Aktivität (PRA)**

Die PRA wurde mit einem Radioimmunoassay der Firma DiaSorin, Düsseldorf gemäß der Anleitung durchgeführt. Eingesetzt wurden je 500  $\mu$ l Plasma (EDTA) und die Differenz zwischen der ANG-I Bildung bei 37°C und 4°C gebildet.

#### **Prostaglandin $E_2$ im Nierengewebe**

Die  $PGE_2$ -Konzentration des Nierencortex wurde unter Verwendung eines monoklonalen EIA Kit der Firma Cayman Chemical, Ann Arbor, USA, bestimmt. Dazu wurden 100 mg Gewebe unter Eiskühlung in eiskalter, isotonischer NaCl-Lösung homogenisiert und anschließend für 10 Minuten bei 10000g zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Bestimmung von  $PGE_2$  und zur Proteinbestimmung nach Lowry verwendet. Der Assay basiert auf der Konkurrenz von dem im Gewebe vorhandenen  $PGE_2$  und einem  $PGE_2$ -Acetylcholinesterase-Konjugat (sog.  $PGE_2$ -Tracer) um eine limitierte Menge an monoklonalen  $PGE_2$ -Antikörpern. Der Komplex aus  $PGE_2$  und monoklonalem Antikörper bindet dann an einen am Boden des Probengefäßes befindlichen, polyklonalen anti-Maus IgG der Ziege. Nach Waschen und Zugabe von Ellman's Reagenz bildet sich ein gelber Farbstoff, dessen Farbintensität spektrophotometrisch vermessen wird. Sie ist proportional zur Menge des am Reaktionsgefäß gebundenen Tracers, dessen Menge umgekehrt proportional zur Menge an während der Inkubation vorhandenem, freien  $PGE_2$  ist.

### 3.7 Statistik

Alle Messdaten sind als arithmetische Mittelwerte ( $\bar{x} \pm SEM$ ; Standardfehler des Mittelwerts) ausgedrückt.

Alle Daten wurden mittels ANOVA (einfaktorielle Varianzanalyse) für die interindividuellen Vergleiche und für die intraindividuellen Vergleiche anhand des zweiseitigen Student's t-Test verglichen.

Dabei wurde folgende Irrtumswahrscheinlichkeit als statistisch signifikant angesehen:

$p < 0,05$ : ★

Die Anzahl der Versuchstiere ist mit „n“ bezeichnet.

## 4 Methode

### 4.1 Tierhaltung

Die Haltung der Tiere erfolgte paarweise in Käfigen (42 x 26 x 18 cm). Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Nahrung. Als Standardfutter wurde Altromin® Pellet-Diät für Ratten und Mäuse gefüttert. Das Streumaterial (Altromin® Tiereinstreufasern) wurde zweimal wöchentlich erneuert.

Durch die Einrichtung einer Klimaanlage konnte für eine konstante Temperatur und Luftfeuchtigkeit gesorgt werden. Es wurde auf folgende für Nager optimale Haltungsparameter geachtet:

- Temperatur:  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Relative Luftfeuchtigkeit:  $55\% \pm 5\%$
- Hell-Dunkelintervall: 12h

Vor Beginn der Versuche wurden die Tiere über einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen an die neue Umgebung adaptiert.

Die orale Applikation der Immunsuppressiva (ca. 1ml) erfolgte mittels einer Schlundsonde jeweils am Vormittag (gegen 9.00Uhr) der Versuchstage. Davor wurde das Körpergewicht der Versuchstiere durch tägliches Wiegen bestimmt. Futter- und Wasserverbrauch wurden ebenfalls täglich durch Wiegen der jeweiligen, im Vergleich zum Vortag verbleibenden Restmengen ermittelt.

### 4.2 Plethysmographische Messung des systolischen Blutdrucks

Während des Versuchszeitraumes wurde die Entwicklung des systolischen Blutdrucks der Versuchstiere mit Hilfe eines Plethysmographen (BP Recorder 8005 der Fa. W+W Electronics, Basel (CH)) verfolgt.

Vor Beginn der eigentlichen Messung mussten die Tiere zuerst in kleinen Käfigen immobilisiert werden. Anschließend wurden sie in einer auf  $36^{\circ}\text{C}$  temperierten Messbox 15 Minuten der Wärme ausgesetzt um die Schwanzarterien der Ratten zu dilatieren. Nach Anlegen von Druckmanschette (Gärtner-Cuff) und Druckaufnehmer wurde der eigentliche Messvorgang durch Aufpumpen der Druckmanschette eingeleitet. Der systolische Blutdruck entspricht dem in den vier Schwanzarterien vorliegenden Maximaldruck. Die Druckmanschette übt beim Aufpumpen einen kontinuierlich steigenden Druck auf die Schwanzarterien aus, bis die Systole erreicht und überschritten ist. Die systolischen arteriellen Pulswellen werden anhand der am Schwanz hervorgerufenen Umfangsveränderungen über einen als Druckaufnehmer dienenden Piezokristall aufgenommen. Die Signale werden über einen Thermoschreiber aufgezeichnet. Die Ausschläge reflektieren die Herzfrequenz. Wenn der Druck in der Manschette den systolischen Blutdruck in den Schwanzarterien erreicht hat, gehen die Ausschläge in eine gerade Linie über. Man kann den zugehörigen Messwert auf einem Spezialpapier ablesen. Der Puls wird vom Messgerät direkt angezeigt.

Die Tiere wurden in einer Vorphase an die Messung gewöhnt, da das Verfahren trotz Schmerzlosigkeit eine Stress-Situation für die Tiere darstellt. Eine direkte Blutdruckmessung in der Arteria carotis communis erfolgte nicht.

### 4.3 Tötung der Versuchstiere und Organentnahme

Die Tötung der Versuchstiere erfolgte mittels Dekapitation nach vorangegangener Inhalationsnarkose mit Sevofluran.

Das dabei erhaltene Vollblut wurde in 4,5ml-K-EDTA Monovetten aufgefangen, zentrifugiert und das überstehende Plasma abpipettiert und bis zur Wiederverwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Ein weiterer Teil wurde zur Bestimmung des Hämatokrit-Wertes in speziellen Kapillaren gesammelt, zentrifugiert und der entsprechende Wert an der zugehörigen Skala abgelesen.

Die entnommenen Organe wurden sorgfältig gesäubert, mit isotoner Kochsalzlösung gespült um sie von Blut zu reinigen und dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Untersuchung wurde das biologische Material bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Bei den Nieren wurden die Einzelgewichte von linker und rechter Niere bestimmt und daraus das Gesamtnierengewicht ermittelt. Vor dem Einfrieren wurden mit einem Skalpells die einzelnen Nierenzonen (Nierencortex, innere Medulla (IM), äußere Medulla (OM)) präpariert und dann ebenfalls schockgefroren.

### 4.4 Isolierung der RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Organen erfolgte anhand der modifizierten Methode nach *Chomczynski und Sacchi (1987)*.

- Um eine Kontamination der RNA durch RNasen zu vermeiden wurden Latexhandschuhe getragen, Rnase-freie Einmalartikel und Geräte verwendet. Glaswaren wurden vor Benutzung drei Stunden bei  $180^{\circ}\text{C}$  im Hitzeschrank sterilisiert.
- Alle benötigten Lösungen wurden mit 0,1%-igem Diethylpyrocarbonat (DEPC) Wasser angesetzt.
- Sämtliche Arbeiten wurden auf Eis ausgeführt.

#### Methode

- Eine definierte Menge Gewebe wurde in Abhängigkeit von der Art des zu untersuchenden Organs in einem 10ml-PPN-Röhrchen mit 1 bis 5 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol-haltiger Lösung D versetzt, dann wurde sofort im Ultra Turrax Mixer homogenisiert.
- Es wurden nun 0,3 ml 2 M Na-Acetatlösung (pH 4,0) (Na-Ac) zugegeben und gevortext.
- Anschließend wurde nach Zugabe von 3 ml wassergesättigtem Phenol erneut gevortext.
- Nach Versetzen mit 600  $\mu\text{l}$  einer Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung wurde wieder gemischt.
- Nach 15-minütiger Kühlung im Eiswasserbad folgte Phasentrennung mittels Zentrifugation: 25 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 3800 U/min, Bremsabschaltung bei 200 U/min.
- Die wässrige Phase (1-5 ml) wurde in ein neues 10ml-PPN-Röhrchen abpipettiert.
- Nach Zugabe von mindestens der gleichen Menge Isopropanol wurde gemischt. Die Ausfällung der RNA erfolgte unter zweistündiger Kühlung bei  $-30^{\circ}\text{C}$  (oder über Nacht).
- Mittels Zentrifugation (25 min, 4000 U/min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) wurde die RNA nun pelletiert.
- Der Überstand wurde verworfen.
- Das Pellet wurde resuspendiert in 500  $\mu\text{l}$  Lösung D + 50  $\mu\text{l}$  Na-Ac + 1250  $\mu\text{l}$  100 % EtOH.
- Nach Mischen folgt zweistündige Lagerung (oder Lagerung über Nacht) bei  $-30^{\circ}\text{C}$ .

- Am nächsten Morgen wurde zentrifugiert, mit 1500 µl 70 % EtOH gewaschen, gemischt und erneut 2 Stunden (oder über Nacht) bei -30 °C stehen gelassen.
- Es wurde erneut zentrifugiert, der Überstand abgekippt und ca. 10 min eingedampft.
- Das Pellet konnte nun in 250 - 1500 µl DEPC-Wasser aufgenommen werden.

### Lösungen zur Isolierung der Gesamt-RNA

Lösung D	250 g Guanidinium thiocyanat 161 ml DEPC-H <sub>2</sub> O 132 ml 0,1 M Na-Citratlösung, pH 7,0 26,4 ml Sarcosyl 10 % Pro 5 ml Lösung D 18 µl β-Mercaptoethanol zusetzen
DEPC- H <sub>2</sub> O	1 ml DEPC in 1000 ml Wasser, autoklavieren
0,1 M Na-Citratlösung, pH 7,0	7,35 g in 250 ml DEPC-Wasser mit 1 M HCl pH einstellen, autoklavieren
Sarcosyl 10 %	10 g in 100 ml DEPC-Wasser, autoklavieren
2 M Natriumacetat, pH 4	41,02 g in 250 ml DEPC-Wasser mit 1 M HCl pH einstellen , autoklavieren
Phenol, wassergesättigt	1 kg geschmolzenes Phenol 1 vol DEPC-H <sub>2</sub> O 0,1 % Hydroxychinolin
Chloroform / Isoamylalkohol	49 ml Chloroform 1 ml Isoamylalkohol

### **4.5 Quantifizierung der RNA**

Die Ausbeute an Gesamt-RNA wurde photometrisch bestimmt durch Messung der Optischen Dichte bei den Wellenlängen 260 nm (RNA) und 280 nm (Proteine). Dazu wurden 5 µl des in DEPC-Wasser suspendierten Pellets und 150 µl DEPC-Wasser gemischt.

Anhand des Quotienten der Extinktion bei 260 nm zu 280 nm kann eine Aussage über Reinheit und Konzentration der isolierten RNA gemacht werden.

Konzentrationsberechnung:  $c[\text{RNA}] \text{ in } \mu\text{g/ml} = \text{Extinktion } 260 \text{ nm} \times 40$

## 4.6 Quantifizierung der mRNA mit dem Protection Assay

### 4.6.1 Prinzip

Unter Verwendung einer, zur mRNA des entsprechenden Genes komplementären, radioaktiv markierten RNA, der sog. cRNA-Sonde, wird die jeweilige mRNA mit hoher Spezifität hybridisiert. Man schafft so stabile Hybride, welche vor RNase-Abbau geschützt sind und mittels Gelchromatographie aufgetrennt werden können. Die Quantifizierung erfolgt über die enthaltene Radioaktivität.

### 4.6.2 Herstellung der radioaktiv markierten cRNA-Sonde zur Detektion von COX-1-, COX-2-, NOS I- und NOS III- mRNA

Die entsprechenden radioaktiv markierten cRNA- Sonden wurden anhand einer linearisierten Plasmid-DNA, in die eine entsprechende cDNA kloniert wurde und mittels einer „ In vitro Transkription “ hergestellt.

#### 4.6.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien („ Maxi Prep“)

Um Plasmid-DNA von großer Reinheit und in größeren Mengen isolieren und reinigen zu können, wurde ein käuflicher Plasmid-Kit von Quiagen® verwendet. Dazu wurde am Vorabend eine 200ml Über-Nacht-Kultur (LB-Medium: 1% Bactotrypton, 0,5% Bactoyeast, 1% NaCl in Wasser, autoklavieren) mit einem Teil der Glycerinkultur, welche freundlicherweise vom Lehrstuhl für Physiologie I, Prof. Dr. Kurtz zur Verfügung gestellt wurde, angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterien werden am nächsten Morgen mittels Zentrifugation pelletiert (4000 rpm, 15 min) und mit Pufferlösungen nach Herstellerprotokoll weiterbehandelt. Die Zellen werden lysiert und anschließend die DNA über eine Säule gereinigt. Nach Fällung mit Isopropanol und 30-minütiger Zentrifugation bei 15000g und 4°C wird der Alkohol abgesaugt und die Pellets getrocknet. Die Pellets werden in 200 µl bidestilliertem Wasser gelöst und die DNA- Ausbeute photometrisch bei 260 nm ermittelt.

#### 4.6.2.2 Kontrollverdau der Plasmide

Zur Linearisierung der Plasmide wird das Restriktionsenzym Hind III verwendet, welches das durch PCR hergestellte und klonierte Fragment wieder herausschneidet. Nach Phenol/ Chloroform Extraktion erfolgt die Auftrennung nach Zusatz von 2 µl Ladepuffer zu den Proben auf 1%igem Agarosegel in 1x TBE-Puffer. Um die Linearisierung überprüfen zu können, wurde neben dem vollständig linearisierten Plasmid (200 ng) die gleiche Menge von zirkulärem Vektor aufgetragen. Nur wenn sich nur eine Bande zeigte und der geschnittene Vektor deutlich langsamer lief als das zirkuläre Plasmid, galt der Vektor als komplett linearisiert.

#### Ansatz für Plasmidlinearisierung

Plasmid	20 µg
Restriktionsenzym	Hind III: 100 units
1x Ofa-Puffer	10 µl ( Mengen von Enzym abhängig )
Aqua bidest	ad 100 µl
2 h / 37 °C	nach 1h 1 µl Enzym zupipettieren

Plasmide

cDNA	Linearisiert mit	Geschütztes Fragment (bp)
β-Actin	HIND III	306
COX-1	HIND III	188
COX-2	HIND III	356
eNOS	HIND III	184
nNOS	HIND III	324
Renin	HIND III	296

**4.6.2.3 In-vitro-Transkription**

Die Herstellung einer radioaktiv markierten cRNA-Sonde erfolgte durch eine in-vitro-Transkription mit SP6-Polymerase unter Einbau von [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-GTP nach Anweisung des verwendeten Amersham-Riboprobe-Systems. Pro Sonde wurde folgender Ansatz pipettiert:

dNTP-Mix (UTP, CTP, ATP, je 6,66 mM)	0,9 $\mu\text{l}$
5x Transkriptionspuffer	1,2 $\mu\text{l}$
DDT (200 mM, RNase-Inhibitor)	0,6 $\mu\text{l}$
vortexen und zentrifugieren	
<b>Mix aus oben</b>	3,25 $\mu\text{l}$
$\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -GTP (= 50 $\mu\text{Ci}$ )	5,0 $\mu\text{l}$
Template (linearisiertes Plasmid, 1 $\mu\text{g}$ / 1 $\mu\text{l}$ )	1,0 $\mu\text{l}$
SP6-RNA-Polymerase (= 80 units)	1,0 $\mu\text{l}$
RNasin (Promega, 20 units/ $\mu\text{l}$ )	0,8 $\mu\text{l}$

Nach Vortexen und Zentrifugation wurde die Mixtur 90 min bei 40°C im Wasserbad inkubiert. Dann erfolgte der Abbau der überschüssigen Plasmid-DNA durch 2  $\mu\text{l}$  RNase-freie DNase (7,5 U/ $\mu\text{l}$ ) bei 40°C für 20 min. Zur Abtrennung von nicht eingebauten radioaktiven Nukleotiden und RNA-Fragmenten wurde der Ansatz auf eine Sephadex ®-G50-Säule (die Säule wurde zuvor mit TE-Puffer (TE + 0,1% SDS) bei 1000 rpm für 3 min equilibriert) gegeben und in folgendem Fällungsreagenz aufgefangen und gemischt:

Natriumacetat 3 M, pH 4,8	10 $\mu\text{l}$
tRNA (10 mg/ml) in DEPC-Wasser	2 $\mu\text{l}$
Ethanol 100 % p.a.	220 $\mu\text{l}$

Die Fällung erfolgt während einstündiger Lagerung bei -20°C. Die Sonde wurde anschließend abzentrifugiert (20 min, 15000 rpm, 4 °C), der Überstand abgezogen, das resultierende Pellet in 100  $\mu\text{l}$  Hybridisierungspuffer resuspendiert und gelöst, bzw. denaturiert (10 min bei 90 °C im Heizblock). 2  $\mu\text{l}$  der Sonde wurden in einem Szintillationsglas mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszient 22) gemischt und in einem Liquid Szintillation Counter (β-Counter, 1500 CarbTM, Packard Inst. Company Downer Grove II) gezählt. Die Sonde wurde so verdünnt, daß 500 000 cpm in 2  $\mu\text{l}$  Sondenlösung vorlagen. Bis zur Hybridisierung wurde die Sonde bei -20°C aufbewahrt.

Lösungen zur Sondenmarkierung

Sephadex G 50	2 g Sephadex ® G-50 ( Pharmacia Biotech ) 50 ml Tris/EDTA- Puffer 0,1 % SDS
Tris/EDTA ( TE )-Puffer	2 M Tris-HCL ( pH 7,5 ) 0,5 M EDTA ( pH 8 )
TE Puffer / 0,1 % SDS ( TES )	TE-Puffer 0,1 % SDS (20 % ); in DEPC
Hybridisierungspuffer	40 mM PIEPES ( pH 6,4 ) 400 mM NaCl 80 % Formamid ( Endkonzentration )

**4.6.3 Hybridisierung der RNA-Proben**

Die RNA-Proben wurden aufgetaut, eine definierte Menge RNA ( 1-200 µg ) wurde in Eppendorf Cups pipettiert. Nach dem Entfernen des Wassers in der Vakuumzentrifuge wurde das Pellet in 50 µl Hybridisierungspuffer resuspendiert. Ebenso wurden 2 µl tRNA ( 10 µg/µl ) in 50 µl Hybridisierungspuffer gelöst. Zu allen Proben und zur tRNA wurde 500 000 cpm radioaktive Sonde pipettiert. Nach Vortexen und Zentrifugieren des Hybridisierungsansatzes wurde 15 min bei 95°C auf dem Heizblock erhitzt. Es folgte eine mindestens sechs- bis maximal achtzehnstündige Hybridisierung über Nacht im Wasserbad bei 60°C.

**4.6.4 RNase Protection Assay**

Nach der Inkubation über Nacht wurde zum Hybridisierungsansatz 350 µl RNase ( A und T1, 1:100 in RNase Puffer verdünnt ) zugegeben, um nicht hybridisierte und damit ungeschützte RNA-Moleküle abzubauen. Der Abbau der einzelsträngigen RNA erfolgte bei RT für 30 min. Zur Spaltung der Proteine wurde 60 µl Proteinase K- Lösung zugegeben und für weitere 30 min im 37°C warmen Wasserbad inkubiert.

Das Hybrid aus RNA und cRNA-Sonde wurde dann mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt und die Phasen durch dreiminütiges Zentrifugieren bei 11000 rpm getrennt. 410 µl der oberen, wässrigen Phase wurden abgenommen, mit 1 Volumenteil Chloroform versetzt und nach kurzem Schütteln erneut für 3 Minuten zentrifugiert. Die Fällung der hybridisierten RNA erfolgte nach Zugabe von 430 µl des wässrigen Überstandes zu einer Mischung aus 900 µl Ethanol 100% und 2 µl tRNA bei -20°C für 1 Stunde.

Die Pelletierung erfolgte durch Zentrifugation ( 15 min, 11000 rpm, 4°C ), der Überstand wurde abgesaugt. Das Pellet wurde mit 5 µl Ladepuffer versetzt, welcher, zur besseren Erkennung der Proben während der Gelelektrophorese, zusätzlich Bromphenolblau enthielt. Nach weiteren 15 Minuten bei 95°C im Heizblock war das Pellet gelöst, bzw. denaturiert.

Lösungen für den RNase Protection Assay

RNase-Puffer	10 mM Tris/HCL pH 7,5 (Endkonzentration) 5 mM EDTA pH 8,0 300 mM NaCl
--------------	---



Proteinase K-Lösung	1 mg/ml Proteinase K in RNase-Puffer + 200 µl SDS (20%) / ml
RNase-Stammlösung	4 mg/ml RNase A (Boehringer) 200 µg/ml RNase T1 (Boehringer) in RNase-Puffer
Polyacrylamid (8%)	Rotiphorese® Kit ( Fa. Roth, Karlsruhe) 320 ml Konzentrat 480 ml Verdünner 100 ml Puffer
Polyacrylamidgel	45 ml Polyacrylamid (8%) 45 µl TEMED / 280 µl APS (8%)
Ladepuffer	0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanol 80 % Formamid in 1x TBE
DEPC-H <sub>2</sub> O	1/1000 Vol Diethylpyrocarbonat in H <sub>2</sub> O ÜN geöffnet unter Abzug, dann autoklavieren
Phenol / Chloroform	Aqua Phenol (Appligene) mit 1M Tris/HCl pH 8 + 100 % Chloroform + 0,1 % Hydroxichinolin

#### 4.6.5 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Das denaturierende Gel wurde immer am Vortag in einer Stärke von 0,5 mm gegossen. Hierzu wurde ein Acrylamid-Gelmix (Rotiphorese® DNA Sequenziersystem) verwendet. Die Polymerisation erfolgte mit wässriger 8% iger Ammoniumpersulfatlösung und Temed (Sigma).

Vor dem Auftragen der Proben lief das Gel mit 1x TBE Puffer bei 80 Watt 30 min. Nach dem Spülen der Taschen mit Laufpuffer wurden die in Eiswasser gekühlten Proben in die Taschen des 8%-igen Acrylamidgels einpipettiert. Die Auftrennung der RNA-Fragmente erfolgte mittels vertikaler Gelelektrophorese für 120 min bei 80 Watt. Das Gel wurde nach beendeter Elektrophorese mit einer Mischung aus 10 Teilen Essigsäure, 10 Teilen Methanol und 80 Teilen Wasser fixiert, auf Whatman-Papier überführt und im Vakuumtrockner bei 80 °C für 2 Stunden getrocknet.

#### 4.6.6 Signalauswertung und Entwicklung der Röntgenfilme

Die Messung der Radioaktivität der einzelnen Banden erfolgte in einem β-Zähler ( Instant Imager 2024, Hewlet Packard, Electronic Audiographie ) mit der entsprechenden Spezialsoftware. Die Counts per minute (cpm)-Werte der einzelnen Proben wurden um den entsprechenden cpm-Wert der tRNA und um die zum Referenzdatum angegebene Aktivität korrigiert. Diese korrigierten Werte wurden schließlich in Bezug zu den cpm-Werten eines parallel angefertigten β-Actin-Protection-Assays derselben RNA-Präparation als externer Standard gesetzt.

Der Film wurde zusätzlich über Nacht bei -70°C exponiert. Nach dem Entwickeln (es wurden nach Vorschrift hergestellte Entwickler-, Unterbrecher- und Fixierlösungen von Agfa verwendet) wurden die einzelnen Banden sichtbar.

## 4.7 Western Blot

### 4.7.1 Proteinaufbereitung aus den Geweben

#### Methode

Zur Aufbereitung der Organe wurden je nach Verfügbarkeit ca. 20 bis 100 mg Gewebe in 4,5 ml PPN Röhrchen eingewogen und mit der 5-fachen Menge kaltem Lysispuffer im Sonifier unter Eiskühlung homogenisiert. Dann erfolgte 5 Minuten lang die Behandlung der Homogenate im eiskalten Ultraschall-Bad. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Überstände in Cups überführt. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert. Die Proteinbestimmung erfolgte kolorimetrisch nach Lowry.

#### Zusammensetzung des Lysispuffers

2,5 g SDS  
0,3 g Tris  
250 ml H<sub>2</sub>O  
pH 7,4 mit HCl einstellen

### 4.7.2 Kolorimetrische Proteinbestimmung nach Lowry

#### Methode

Die zur Bestimmung der Proteinexpression gedachten Proben wurden einer 1:5-Verdünnung mit Lysispuffer unterzogen. 100 µl der unverdünnten, bzw. verdünnten Probe wurden gemäß Vorschrift des Testkits der Firma Sigma Diagnostics mit 1100 µl Biuret-Reagenz versetzt und dann 10 min stehengelassen. Nach Zugabe von je 30 µl Folins-Reagenz wurde erneut 30 min gewartet und anschließend die Extinktion bei 725 nm gemessen.

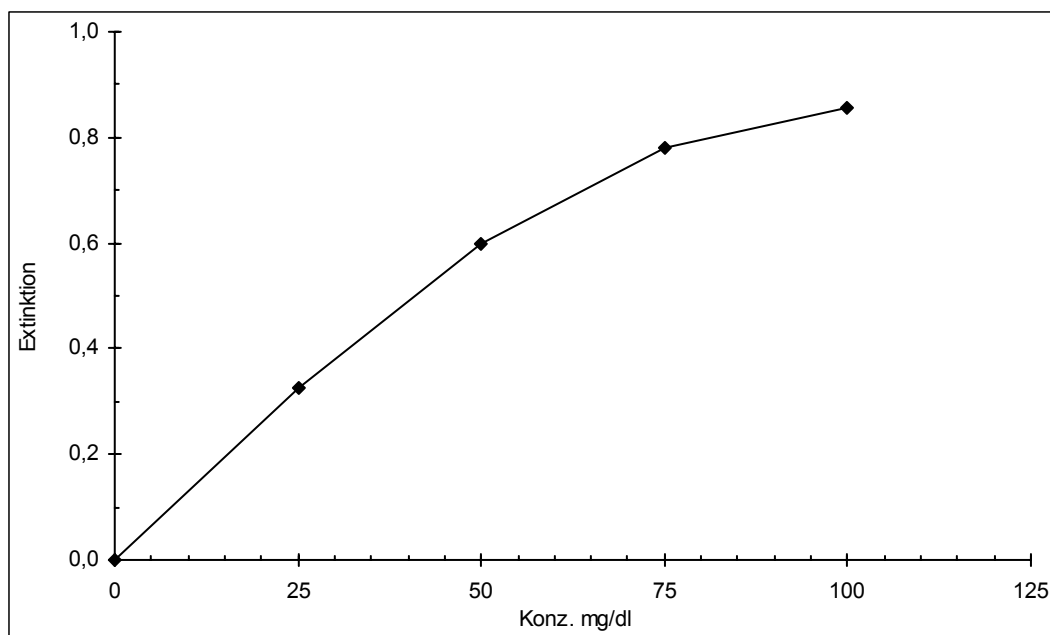


Abb. 09 Standardgerade zur quantitativen Bestimmung des Proteingehalts nach Lowry.

Die entsprechenden Proteinkonzentrationen wurden anhand einer Standardkurve ermittelt, welche identisch behandelt worden war.

#### 4.7.3 Auftrennung von Proteinen mit SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Proteine können aufgrund unterschiedlicher Molekulargewichte elektrophoretisch aufgetrennt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Die Elektrophoresen wurden mit vertikalen, diskontinuierlichen Minigelen, bestehend aus Sammel- und Trenngel, in der Mini-Protean II<sup>®</sup> Elektrophorese-Einheit der Firma Biorad durchgeführt.

##### Zusammensetzung der Gele

Gelkomponenten	Sammelgel 4 %ig für COX und NOS	Trenngel 10 %ig für COX-1/-2	Trenngel 6 %ig für NOS I/-III
Aqua destillata	3050 µl	4000 µl	5350 µl
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	---	2500 µl	2500 µl
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	1250 µl	---	---
10 % (w/v) SDS Stock	50 µl	100 µl	100 µl
Biorads 30 % Acrylamid- Bisacrylamid 37,5:1 Mix	665 µl	3300 µl	2000 µl
Nach Mischen, Filtrieren und 5- bis 10- minütiger Entgasung erfolgt die Zugabe folgender Komponenten und unmittelbar darauf das Gießen der Gele.			
20 % (w/v) TEMED	5 µl	10 µl	5 µl
10 % (w/v) Ammonium- persulfat, frisch hergestellt	25 µl	80 µl	50 µl

Nachdem das Trenngel bis ca. 2 cm unter den Rand des Gelgiesstandes gefüllt wurde, musste es sofort mit Methanol überschichtet werden. Das Trenngel benötigte etwa 45 min um zu polymerisieren. Anschließend wurde der Methanol abgegossen, Reste gründlich mit Wasser entfernt, das Sammelgel gegossen und sofort ein Probenkamm eingesetzt. Nach Entfernen des Probenkamms wurden jeweils ca. 20 µl der vorher mit Sample-Puffer im Verhältnis 1:4 verdünnten und für 5 min bei 95°C denaturierten Probe, mit einem Gehalt von 50 oder 100 µg Gesamtprotein, in die Geltaschen pipettiert.

##### Zusammensetzung des Sample-Puffers

Aqua destillata	11,4 ml
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	3,0 ml
Glycerol	2,4 ml
10% (w/v) SDS	4,8 ml
2-Mercaptoethanol	1,2 ml
1%(w/v) Bromphenolblau	1,2 ml

Zusätzlich wurden bei den NO-Synthasen die entsprechenden Positivkontrollen aufgetragen.

**NO-Synthase**  
NOS I (nNOS), 155 kDa  
NOS III (eNOS), 140 kDa

**Positiv-Kontrolle (2 µg)**  
Rat Pituitary Lysate  
Human Endothelial Lysate

Bei allen Proteinen wurde zusätzlich noch ein Kaleidoskopstandard der Firma Biorad als Molekulargewichtsmarker aufgetragen.

### Elektrophorese

Die Elektrophorese erfolgte für alle Proteine bei 110 V für 2 h in 1x Elektrophorese-Puffer.

### Zusammensetzung des Elektrophorese-Puffers (5x), pH 8,3

Tris-Base	15 g/l
Glycin	72 g/l
SDS	5 g/l

### **4.7.4 Transfer aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose (Western Blot)**

Die aufgetrennten Proteine wurden nach der Elektrophorese mittels Wet-Transfer-Blotting zwischen Graphitplattenelektroden elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dazu musste das Gel von den Glasplatten gelöst werden und auf die zuvor in Blotting-Puffer eingelegte Nitrozellulosemembran übertragen werden. Auf die Anodenplatte der verwendeten Fast-Blot-Apparatur der Firma Biorad wurden dazu von unten nach oben in folgender Reihenfolge

1. eine Glasfasermatte,
2. drei Lagen in Blottingpuffer eingeweichtes Blottingpapier,
3. das Polyacrylamidgel mit den aufgetrennten Proteinen,
4. die Nitrozellulosemembran,
5. wiederum drei Lagen Blottingpapier,
6. die zweite Glasfasermatte, und
7. die Kathodenplatte aufgelegt.

Das Blotting wurde stets im Kühlschrank durchgeführt, um einer großen Wärmeentwicklung im Inneren des Systems entgegenzuwirken.

### Zusammensetzung des Blottingpuffers

Tris-HCl	15 g/l
Glycin	14 g
Methanol	200 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

### Zeitlicher Verlauf des Blotting-Vorgangs der NO-Synthasen

Aufeinander folgende Zeitintervalle	Stromstärke
15 min	150 mA
120 min	250 mA
15 min	350 mA

### Zeitlicher Verlauf des Blotting-Vorgangs der Cyclooxygenasen

Aufeinander folgende Zeitintervalle	Stromstärke
120 min	150 mA

#### 4.7.5 Blockierung unspezifischer Bindungsstellen

Nach beendetem Blotting wurde die Membran zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur in einem 5%-igem Magermilch-TBS-Puffer inkubiert. Danach wurde der Blocking-Puffer durch zweifaches, 10-minütiges Waschen mit TBS-T-Puffer restlos entfernt.

##### **TBS-Puffer pH 7,4**

1 M Tris/HCl  
1 M NaCl  
25 mM MgCl<sub>2</sub>

##### **TBS-T-Puffer pH 7,4**

1000 ml TBS-Puffer  
500 µl Tween 20

#### 4.7.6 Immunochemische Detektion der Proteine mittels Chemilumineszenz

Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C oder 2h bei RT. Dazu wurde der Antikörper 1:500 in 5 % iger Magermilch verdünnt.

##### **NO-Synthase**

NOS I (nNOS) 155 kDa  
NOS III (eNOS) 140 kDa

##### **Primärer Antikörper, Firma**

IgG<sub>2a</sub> Maus ; Transduction Laboratories  
IgG<sub>1</sub> Maus ; Transduction Laboratories

##### **Cyclooxygenase**

COX-1, 70 kDa  
COX-2, 72 kDa

##### **Primärer Antikörper, Firma**

Muriner polyklonaler IgG, Hase; Cayman Chemicals  
Muriner polyklonaler IgG, Hase; Cayman Chemicals

Danach wurde 3 Mal für je 15 min mit TBS-Puffer gewaschen. Die Komplexierung mit dem sekundären Antikörper (1:500 verdünnt) erfolgte bei RT für 1,5h. Es handelte sich hierbei um mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper.

##### **Protein**

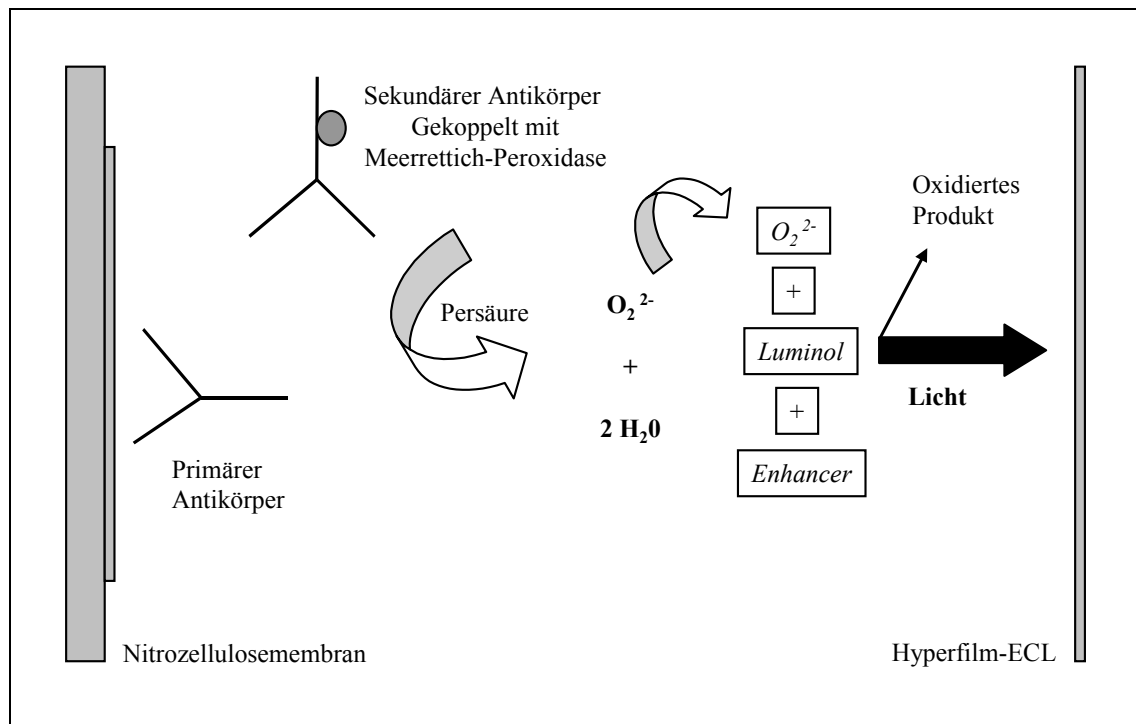
NOS I, NOS III  
COX-1, COX-2

##### **Sekundärer Antikörper, Firma**

Anti-Maus-IgG-HRP; Transduction  
Anti-Hase-IgG-HRP, Ziege; Santa Cruz Biotechnology

Die Detektion erfolgte mittels des ECL (Enhanced Chemiluminescence)- Kits der Firma Amersham. Hierzu wurden gleiche Volumina der Detektionslösung 1 und 2 gemischt und vorsichtig auf die Nitrozellulosemembran aufgetragen. Das Gemisch wurde nach etwa 1 min abgesaugt. Die Membran wurde dann ohne Luftblasen zwischen 2 durchsichtige Kopierfolien transferiert. Anschließend wurden die Folien 5 Minuten lang einem Röntgenfilm exponiert. Die Nachweisreaktion beruht auf der Oxidation von Luminol durch die Meerrettich-Peroxidase.

Durch densitometrische Bestimmung der optischen Dichte (OD in %) der Banden konnten semiquantitative Aussagen zur Proteinexpression gemacht werden.

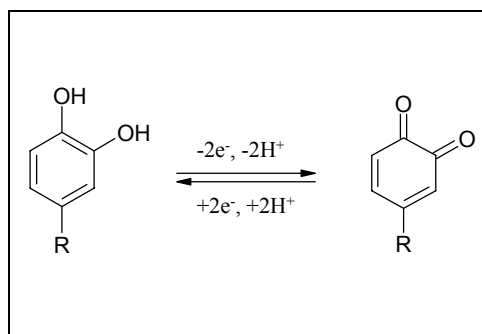


**Abb. 10** Nach Amersham Life Science: The principles of ECL Western Blotting.

## 4.8 Bestimmung der Katecholamine des Nierencortex

### Prinzip

Katecholamine können mittels Hochdruck-Flüssig-Chromatographie (HPLC) unter Verwendung eines elektrochemischen Detektors bestimmt werden. Als Nachweisreaktion dient die selektive Autoxidation des, für alle Katecholamine charakteristischen, 3,4-Dihydroxyphenylrings zu einem 3,4-ortho-Chinonderivat.



**Abb. 11** Oxidation des 3,4-Dihydroxyphenylrings zum 3,4-ortho-Chinonderivat.

Die Konzentrationen der einzelnen Katecholamine können anhand ihrer unterschiedlichen Retentionszeiten über die jeweiligen Peakhöhen des Chromatogramms und unter Verwendung von 3,4-Dihydroxybenzylamin (DBA) als internem Standard ermittelt werden.

### Methode

Die Aufbereitung der Proben erfolgte unter ständiger Eiskühlung nach *Dehner et al.* (1989). Dazu wurden ca. 200 mg Gewebe in ein 4,5ml-PPN-Röhrchen eingewogen und mit der zehnfachen Menge an Homogenisationslösung versetzt. Als internen Standard enthielt die Homogenisationslösung 10 ng DBA/ml.

#### **Homogenisationslösung**

70%ige Perchlorsäure	1.72 ml
L(+) Ascorbinsäure	5 mg
Titriplex (Na-EDTA)	25 mg
DBA-Stammlösung (1 µg/ml)	1 ml
Aqua dest.	ad 100 ml

Nach Homogenisation mittels Ultra Turrax und 15-minütiger Lagerung im Kühlschrank erfolgte 5-minütige Zentrifugation (4000 g). 1 ml des klaren Überstandes wurde nun in 2,2ml-Eppendorf-Cups pipettiert, in welche man zuvor 20 mg Aluminiumoxid, 500 µl 3 M TRIS-HCl pH 8,6 und 50 µl 50 mM Glutathion vorgelegt hatte.

#### **3 M Tris-HCl (MG 121,1), pH 8,6**

TRIS	36,3 g
Aqua dest.	70 ml
HCl konz.	15 ml
HCl konz.	auf pH 8,6 titrieren
Aqua dest.	zur Messmarke auffüllen

**50 mM GSH (MG 307,3)**

GSH	75 mg
Aqua dest.	5 ml

Zur Adsorption der Katecholamine an das enthaltene Aluminiumoxid folgte eine 15-minütige Über-Kopf-Schüttelperiode bei Raumtemperatur mit anschließender Zentrifugation. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zentrifugat 3 mal mit Triswasser (100 µl 3 M TRIS-HCl mit 100 ml Wasser verdünnt) gewaschen. Zur Desorption der Katecholamine werden 250 µl 50 mM Perchlorsäure zugegeben und wiederum 15 Minuten über Kopf geschüttelt. 150 µl des durch erneute Zentrifugation erhaltenen Überstandes wurden in ein Minivial überführt. Hiervon wurde ein Aliquot von 25 µl in die HPLC-Anlage injiziert.

Am Anfang, in der Mitte und am Ende der eigentlichen Proben wurde je ein Referenzstandard mitbestimmt.

**Zusammensetzung des Referenzstandards**

Katecholamin-Stammlösung, 1 µg/ml	50 µl
DBA, 1 µg/ml	50 µl
0,1 M PCA	1900 µl

**Katecholamin-Stammlösung, 100 µg / ml**

100 ml 0,1 M PCA mit 100 µl 0,1 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (1,9 g / 100 ml) mischen.

Für eine Konzentration von jeweils 100 µg Katecholamin/ml werden 18,9 mg NA-Bitartrat, 18,2 mg A-Bitartrat, 12,4 mg DA-HCl bzw. 15,8 mg DBA-HBr in einen 100 ml Messkolben eingewogen und mit der PCA-Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> - Mischung ad 100 ml aufgefüllt.

**0,1M PCA**

8,6 ml 70%-ige HClO<sub>4</sub> mit 1 Liter Aqua dest. mischen und 370 mg Na-EDTA zugeben.

**Mobile und stationäre Phase****Mobile Phase, pH 5,4**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	6,9 g
Sodiumoctansulfonat (SOS), p.a.	100 mg
Na-EDTA	50 mg
Essigsäure	3 ml
Acetonitril	40 ml
Methanol	20 ml
Aqua dest.	1000 ml
NaOH, 10 N	PH-Wert-Einstellung

**Stationäre Phase**

Phenomenex Luna <sup>®</sup> C18	5µm Fertigsäule, Ø 4,6 x 150 mm
----------------------------------	---------------------------------

**Parameter am Meßsystem****Parameter am HPLC-System**

Flussrate	1 ml/min
Druck	Ca. 1200 psi
Säulentemperatur	30°C ± 1°C
Detektor-Potential	0,6 V



**Retentionszeiten**

Noradrenalin	ca. 4,3 - 4,5 min
Adrenalin	ca. 5,8 - 6,3 min
DBA	ca. 7,0 – 7,9 min
Dopamin	ca. 11,3 – 12,9 min

Auswertung

Zur Berechnung diene folgende Formel:

$$\text{Konz}_{\text{CA/Probe}} [\text{ng/ml}] = \frac{\text{Peak}_{\text{CA/Probe}}}{\text{Peak}_{\text{DBA/Probe}}} \times \frac{\text{Peak}_{\text{DBA/SR}}}{\text{Peak}_{\text{CA/SR}}} \times \text{Menge}_{\text{DBA/IS}} [\text{ng}] \times \text{VF}$$

VF: Verdünnungsfaktor

IS: Interner Standard

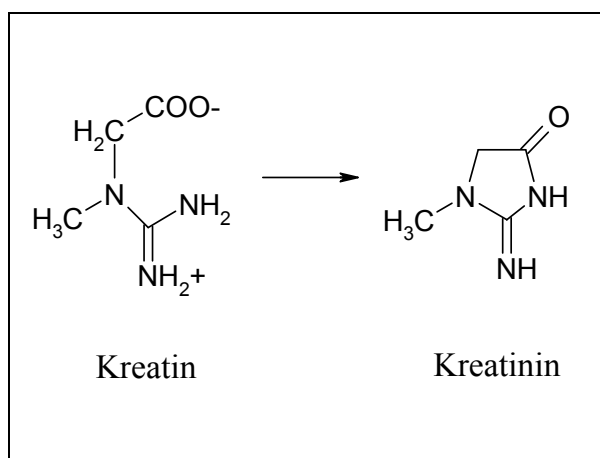
CA: Katecholamine

SR: Referenzstandard

## 4.9 Bestimmung des Plasmakreatinins

### Prinzip

Kreatinin ist das innere Amid von Kreatin, einem Zwischenprodukt des Intermediärstoffwechsels, welches als Phosphorsäureverbindung in den Muskeln vorkommt. Kreatinphosphat dient dort zur ATP-Gewinnung durch direkte Phosphorylierung von ADP. Aufgrund seines niederen Molekulargewichts wird das Anhydrid Kreatinin in den Nieren frei filtriert und mit dem Urin ausgeschieden. Bei eingeschränkter Nierenfunktion (oberhalb des Kreatinin-blinden Bereichs, Erhöhung über 50% des Normalwertes) erhöht sich die Konzentration des im Plasma nachweisbaren Kreatinins.



**Abb. 12** Umwandlung von Kreatin zu Kreatinin.

Die Kreatinin-Bestimmung erfolgte unter Enteiweißung anhand der Jaffé-Methode. Die Reaktion basiert auf der Bildung eines farbigen Komplexes zwischen Kreatinin und der in alkalischer Lösung als Pikrat vorliegenden Pikrinsäure.

### Methode

Zur Enteiweißung wurden 1ml Plasma mit 1ml 1,2 M-Trichloressigsäure gemischt. Der sich bildende Niederschlag wurde abzentrifugiert (4000g, 4°C, 10 min) und der resultierende klare Überstand in ein trockenes Reagenzglas pipettiert.

#### **Leerwert**

Aqua dest.	500 µl
Trichloressigsäure 1,2 mol/l	500 µl

#### **Standard**

Lösung 3 (2mg Kreatinin/dl)	500 µl
Trichloressigsäure 1,2 mol/l	500 µl

Anschließend wurden zu Leerwert, Standard und Probe (1000µl Überstand) je 1 ml einer Mischung aus gleichen Anteilen 1,6 M-NaOH und 35 mM-Pikrinsäure zugegeben. Nach Mischen wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die spektralphotometrische Messung der Extinktionen von Proben und Standard erfolgte bei 25°C in einer Küvette der Schichtdicke von 1 cm bei einer Wellenlänge von 520 nm.

#### Auswertung

Die Kreatinin-Konzentration wurde anhand folgender Formel berechnet:

$c \text{ [ mg/dl ]} = 2,0 \times \frac{E_{\text{Probe}}}{E_{\text{Standard}}}$	$c \text{ [ } \mu\text{mol/l ]} = 177 \times \frac{E_{\text{Probe}}}{E_{\text{Standard}}}$
---	--

#### **4.10 Bestimmung des Hämatokrits**

Der Hämatokrit gibt Auskunft über den Anteil zellulärer Bestandteile am Gesamtblutvolumen. Da Blutzellen ein höheres spezifisches Gewicht haben als Blutplasma, lässt sich der Hämatokrit durch Zentrifugation des bei der Dekapitation gewonnenen venösen Blutes bestimmen.

#### Methode

Das Blut wurde hierzu in Kapillaren aufgezogen und diese in einer Hämatokrit-Zentrifuge 3 min lang bei 12500 rpm zentrifugiert. Mit Hilfe eines Hämatokritlineals konnte der entsprechende Volumenanteil abgelesen werden.

#### **4.11 Immunhistochemische Untersuchungen**

Zur Bestätigung der Ergebnisse der Gen- und Proteinexpression von Renin und COX-2 in den Nieren wurden immunhistochemische Färbungen der jeweiligen Proteine durchgeführt.

#### Probengewinnung, Probenfixierung und Einbettung in Paraffin

Zur immunhistochemischen Detektion des Renins und der Cyclooxygenase 2 wurde bei der Organentnahme jeweils eine Niere für die histologische Präparation verwendet. Die nach Organentnahme von der Kapsel befreite Niere wurde mit einer Rasierklinge längs halbiert und sofort in 50 ml Methyl-Carnoy-Lösung (10% Eisessig, 30% Chloroform, 60% Methanol) fixiert. Danach wurde die Probe dehydriert unter Verwendung steigender Konzentrationen von Methanol. Der letzte Dehydrierungsschritt erfolgte in absolutem Methanol. Nach Entfernung letzter Reste von Wasser und Methanol durch Überführung in ein Intermedium (absoluter Isopropanol) erfolgte die Einbettung in Paraffin. Dazu wurde das Präparat für 30-60 min in einer gesättigten Lösung von Paraffin in Isopropanol bei 35-40°C im Wärmeschrank durchtränkt. Erst dann konnte das Gewebe in geschmolzenes, reines Paraffin überführt werden. Dabei musste das Paraffin zur Entfernung von Isopropanol mehrmals erneuert werden. Nachdem das Präparat in einer Stahlform mit Paraffin ausgegossen worden war, konnte es aushärten und im Anschluss auf einen Holzblock montiert werden.

### Färben des Präparats

Nachdem mit Hilfe eines Mikrotoms (Leitz SM 200R, Leica Instruments) 4 µm dicke Scheiben des Präparats geschnitten worden waren, wurden diese auf einen Objektträger gelegt und durch vorsichtiges Erhitzen auf 30-35°C, unter Zusatz von Wasser, geglättet und fixiert. Erst nach vollständigem Trocknen konnte das Paraffin durch kurzes Eintauchen in Xylol entfernt werden.

### Detektion von COX-2 und Renin

Die Farbreaktion basiert auf der Reaktion der Proteine mit einem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten, monoklonalen Antikörper. Dazu muss zuerst die endogene Peroxidase-Aktivität des Präparats durch 20-minütigen Zusatz von 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol bei Raumtemperatur blockiert werden. Erst dann kann über Nacht die Inkubation mit dem jeweiligen primären, monoklonalen Antikörper erfolgen. Der sekundäre Antikörper ist ein Biotin-konjugierter anti-Ziegen IgG des Hasen (1:200 verdünnt). Nach seiner Zugabe wird inkubiert mit einem Avidin-D-Meerrettich-Peroxidase Komplex. Nach erfolgter Inkubation wird mehrmals gewaschen. Die Farbreaktion wird durch Zugabe von 0,02%-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Peroxidquelle) und Diaminobenzidin-4xHCl ausgelöst. Zur Gegenfärbung dient die Hämalun-Eosin-Färbung.

### Gegenfärbung mit Hämalun-Eosin

Die Hämalun-Eosin (HE) Färbung dient zur selektiven Färbung des Zellkerns. Diese Färbung beruht darauf, dass sich der positiv geladene Farbstoffkomplex aus Hämatein und dem enthaltenen Al<sup>3+</sup>-Salz an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA anlagert. Nach 5- 8 Minuten muss mit warmem Wasser gewaschen werden. Dadurch tritt die Blaufärbung hervor und wird das Präparat gleichzeitig fixiert. Die notwendige Gegenfärbung des Zytoplasmas erfolgt mit Eosin, einem wasserlöslichen Triphenylmethan-Farbstoff, der danach mit Wasser ausgewaschen wird.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Genetisch bedingt Hypertonie

#### 5.1.1 Versuchsmodell

Im ersten Teil der Dissertation wurden nicht medikamentös behandelte 3 und 7 Wochen alte männliche spontan hypertensive Ratten (SHR) und Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) als deren normotensive Kontrolle untersucht. Das gewählte Alter der SHR ist entscheidend für die Entwicklung des Bluthochdrucks. Dies manifestiert sich bei SH-Ratten in einer ab der 3. Lebenswoche einsetzenden charakteristischen Beschleunigung des Blutdruckanstiegs gegenüber WKY-Tieren.

#### 5.1.2 Entwicklung von Körpergewicht, Futter- und Wasserverbrauch

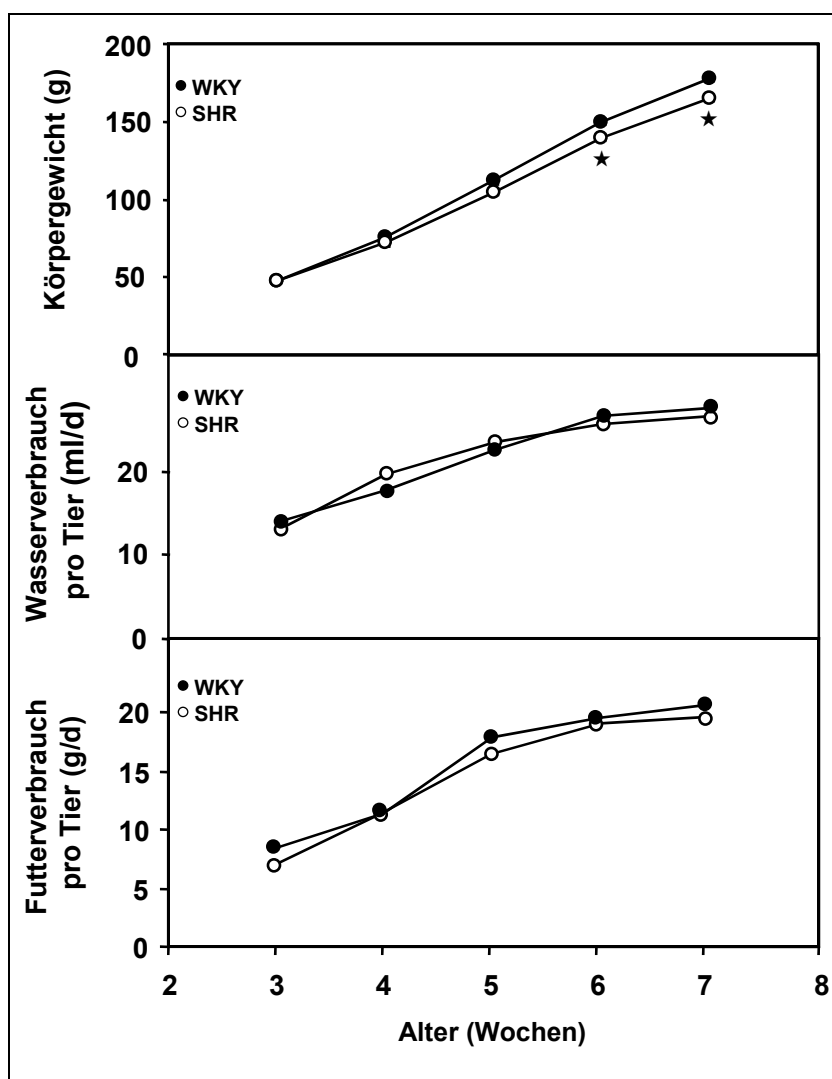


Abb. 13 zeigt die Entwicklung von Körpergewicht, Futter- und Wasserbedarf von jeweils sechs 3 Wochen alten SHR und WKY-Ratten bis zum Erreichen der siebten Lebenswoche.

Bei beiden Stämmen kommt es parallel zum Anstieg des Körpergewichts auch zu einem stetig zunehmendem Wasser- und Futterbedarf.

Unterschiede zeigen sich nur im Körpergewicht, welches sich während der dritten bis fünften Woche nicht unterscheidet, jedoch ab der sechsten Lebenswoche bei SHR signifikant geringer ist als bei der normotensiven Kontrolle.

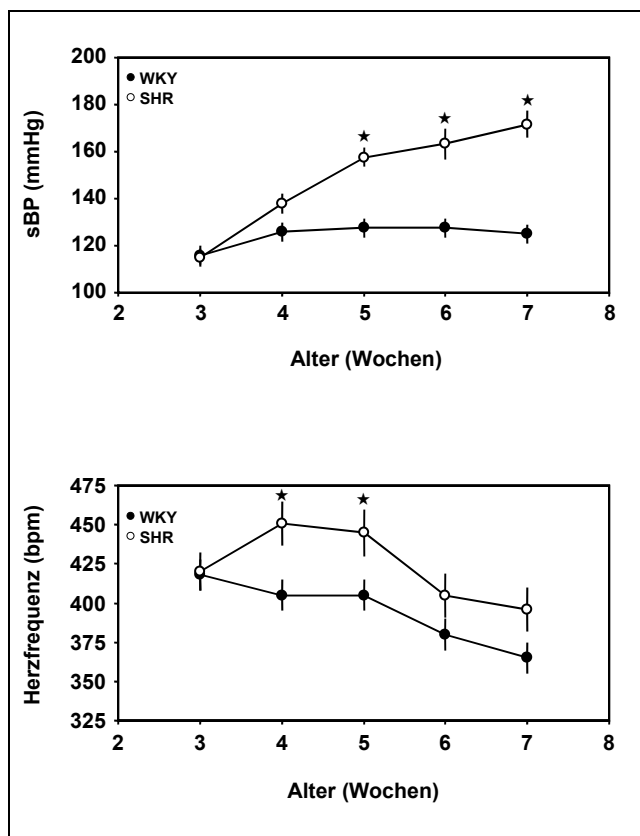
Diese Entwicklung des Körpergewichts stimmt überein mit entsprechenden Beobachtungen anderer Autoren (*Chou et al., 1998; Hayakawa et al., 1998; Vaziri et al., 1998*).

Abb. 13 Entwicklung von Körpergewicht, Futter- und Wasserverbrauch bei SHR und WKY ( $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ; \* $p < 0,05$  vs WKY).

#### 5.1.3 Kardiovaskuläre Parameter

##### 5.1.3.1 Altersentwicklung von Blutdruck und Herzfrequenz

Die zwischen der dritten und siebten Lebenswoche nachgewiesenen Veränderungen von Blutdruck und Herzfrequenz sind in Abb. 14 dargestellt.



**Abb. 14** Altersentwicklung von Blutdruck und Herzfrequenz bei SHR und WKY ( $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ;  $\star p < 0,05$  vs WKY).

### 5.1.3.2 Relatives Herzgewicht

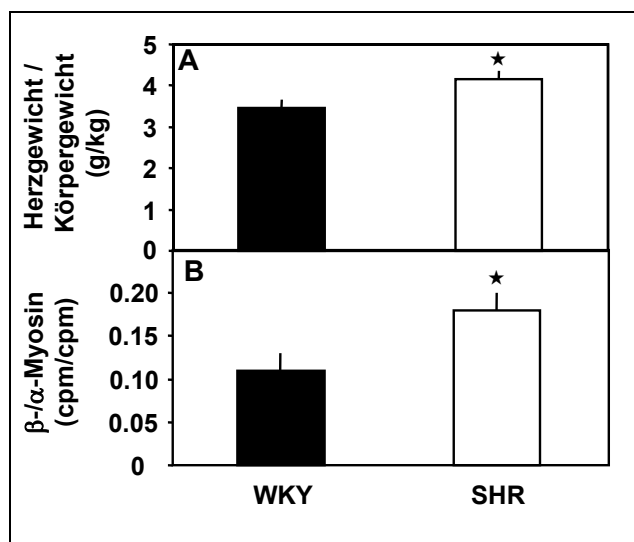
Nach dem Erreichen der 7. Lebenswoche wurde bei den SH- und WKY-Tieren das Herzgewicht ermittelt. Da die zu diesem Zeitpunkt bereits hypertensiven SH-Ratten eine geringere Gewichtszunahme zeigten, wurde das Herzgewicht auf das entsprechende Körpergewicht der Tiere bezogen. Dieses relative Herzgewicht, dargestellt in Abb. 15 A, war bei SHR im Vergleich zu WKY signifikant erhöht.

### 5.1.3.3 $\beta$ - $\alpha$ -Myosin-Ratio im Herzen

SH- Ratten entwickeln aufgrund des erhöhten Blutdrucks viele charakteristische Organ-Schäden wie z.B. renale Dysfunktion, Herzversagen oder Herzhypertrophie (*Pinto et al., 1998*). Das Verhältnis von  $\beta$ -Myosin mRNA zu  $\alpha$ -Myosin mRNA ist ein molekularbiologischer Parameter zur Beurteilung des Entwicklungszustandes und der Funktion des Herzmuskels. Je kleiner die Ratio ist, desto günstiger ist dies für die normale Herzentwicklung. Abb. 15 B zeigt deutlich, dass es bei den 7 Wochen alten SH-Tieren bereits nach 3-wöchiger Hypertonie neben der Herzgewichtszunahme auch zu einer signifikanten Erhöhung der Myosin-Ratio gegenüber altersgleichen WKY-Tieren kommt.

WKY haben ab der 4. Lebenswoche einen systolischen Blutdruck von ca. 125 mmHg, der sich mit zunehmendem Alter nicht mehr verändert. Aufgrund der genetischen Disposition beginnt hingegen bei SH-Ratten der Blutdruck ab der 4. Woche anzusteigen. Bereits ab der 5. Lebenswoche ist er mit ca. 160 mmHg signifikant gegenüber WKY erhöht und steigt kontinuierlich weiter an auf Werte um 175 mmHg in der 7. Lebenswoche.

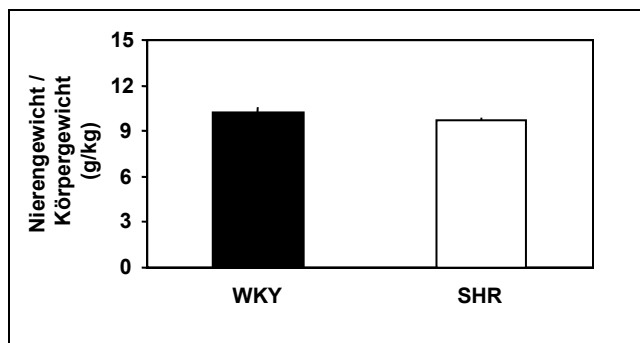
Im Gegensatz zu den sich unterschiedlich entwickelnden Blutdrücken verläuft die Entwicklung der Herzfrequenz bei beiden Stämmen relativ ähnlich. Es kommt von der 3. zur 7. Lebenswoche zu einer Verringerung der Herzfrequenz, von anfänglich gleichen Werten um 420 Schläge, auf Werte von etwa 375 (WKY) bzw. 400 (SHR) Schläge pro Minute in der 7. Woche. Lediglich in der 4. und 5. Lebenswoche ist die Herzfrequenz bei SHR signifikant höher als bei WKY. Ansonsten entsprechen sich die Werte von SHR und WKY.



**Abb. 15** Relatives Herzgewicht und  $\beta$ - $\alpha$ -Myosin-Ratio im Herzen bei SHR und WKY ( $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ;  $\star p < 0,05$  vs WKY).

### 5.1.4 Renale Parameter

In Anbetracht der Bedeutung der Niere für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der genetisch bedingten Hypertonie liegt der Schwerpunkt der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen auf Veränderungen in der Niere bzw. auf der veränderten Gen- und Proteinexpression der Nieren.

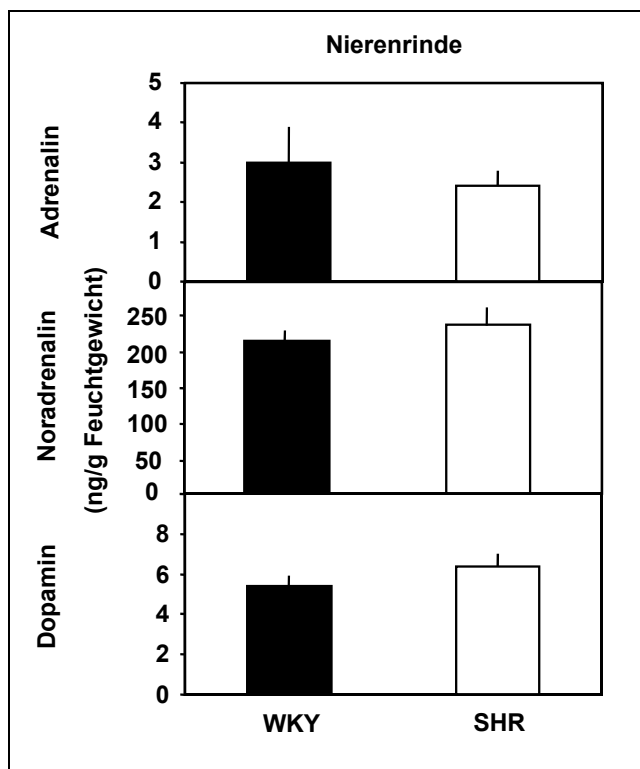


**Abb. 16** Relatives Nierengewicht bei 7 Wochen alten SHR und WKY (n = 6,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ).

#### 5.1.4.1 Relatives Nierengewicht

Das Nierengewicht wurde als erster Parameter gleich nach Dekapitation der 7 Wochen alten Tiere bestimmt. Wie Abb. 16 zeigt, konnte zu diesem Zeitpunkt beim relativen Nierengewicht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Rattenstämmen festgestellt werden.

#### 5.1.4.2 Katecholamine in der Nierenrinde

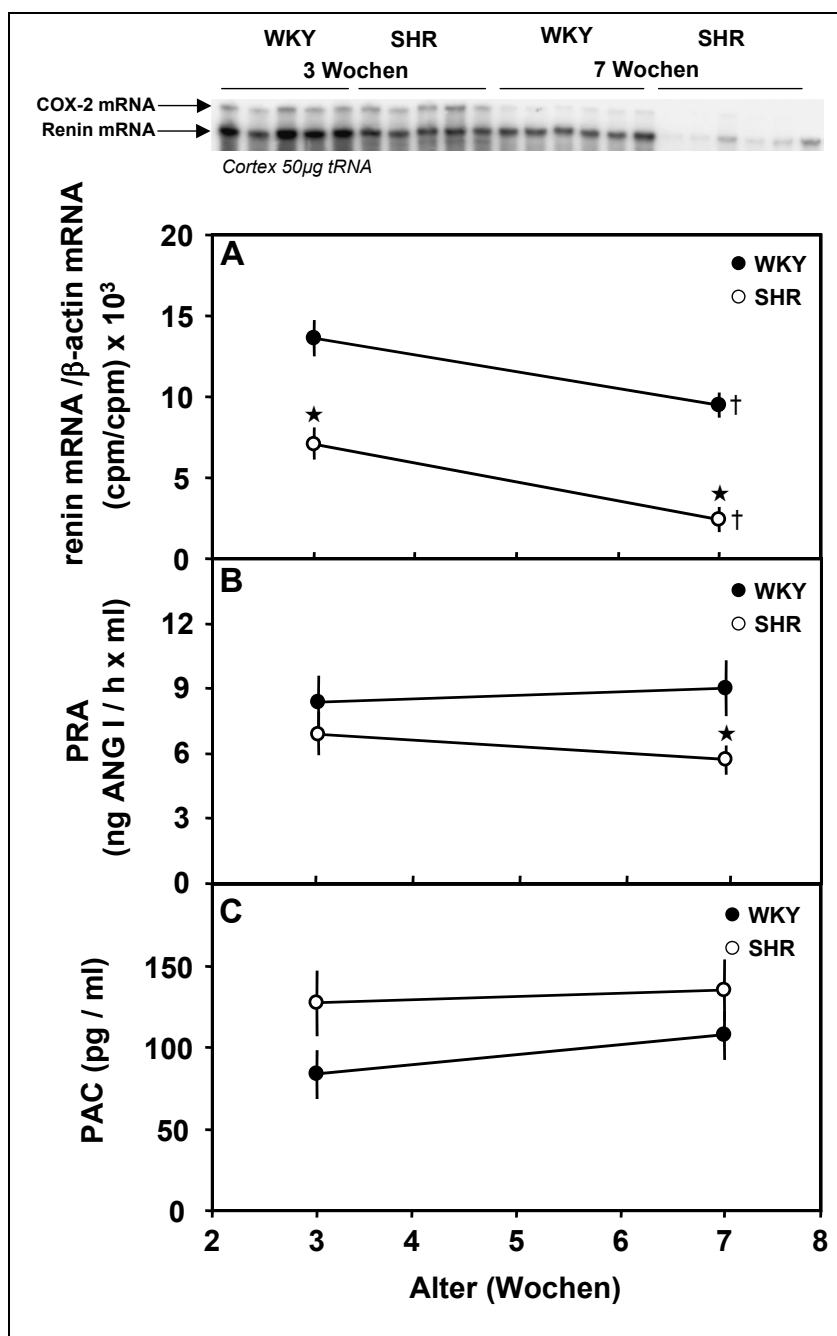


**Abb. 17** Katecholamingehalt der Nierenrinde bei 7 Wochen alten SHR und WKY (n = 6,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ).

Bei der Bestimmung der Katecholamine Adrenalin und Dopamin im Nierencortex, konnten bei 7 Wochen alten SH- und WKY-Ratten nur sehr geringe, bei Noradrenalin höhere, aber sich ebenso nicht signifikant unterscheidende Konzentrationen nachgewiesen werden.

### 5.1.5 Renin mRNA Genexpression, Plasmarenin-Aktivität und Plasmaaldosteron-Konzentration bei 3 und 7 Wochen alten SHR und WKY.

Die Veränderungen im Renin-Angiotensin-System sind in Abb. 18 dargestellt.



**Abb. 18** Renin mRNA Genexpression (A), Plasmarenin-Aktivität PRA (B) und Plasmaaldosteron-Konzentration PAC (C) bei 3 und 7 Wochen alten SHR und WKY (n = 6,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ; \* $p < 0,05$  vs WKY ; †  $p < 0,05$  vs 3 Wochen).

Die basale Renin Genexpression nahm sowohl bei SHR als auch bei WKY im Alter signifikant ab. Dabei zeigten SH-Ratten zu jedem Zeitpunkt eine gegenüber WKY signifikant verringerte Genexpression (Abb. 18 A).

Die Plasmarenin-Aktivität war bei 7 Wochen alten SH-Ratten signifikant niedriger als bei gleich alten, normotensiven Kontrolltieren. Eine altersabhängige Verringerung konnte jedoch weder bei SHR, noch bei WKY festgestellt werden (Abb. 18 B).

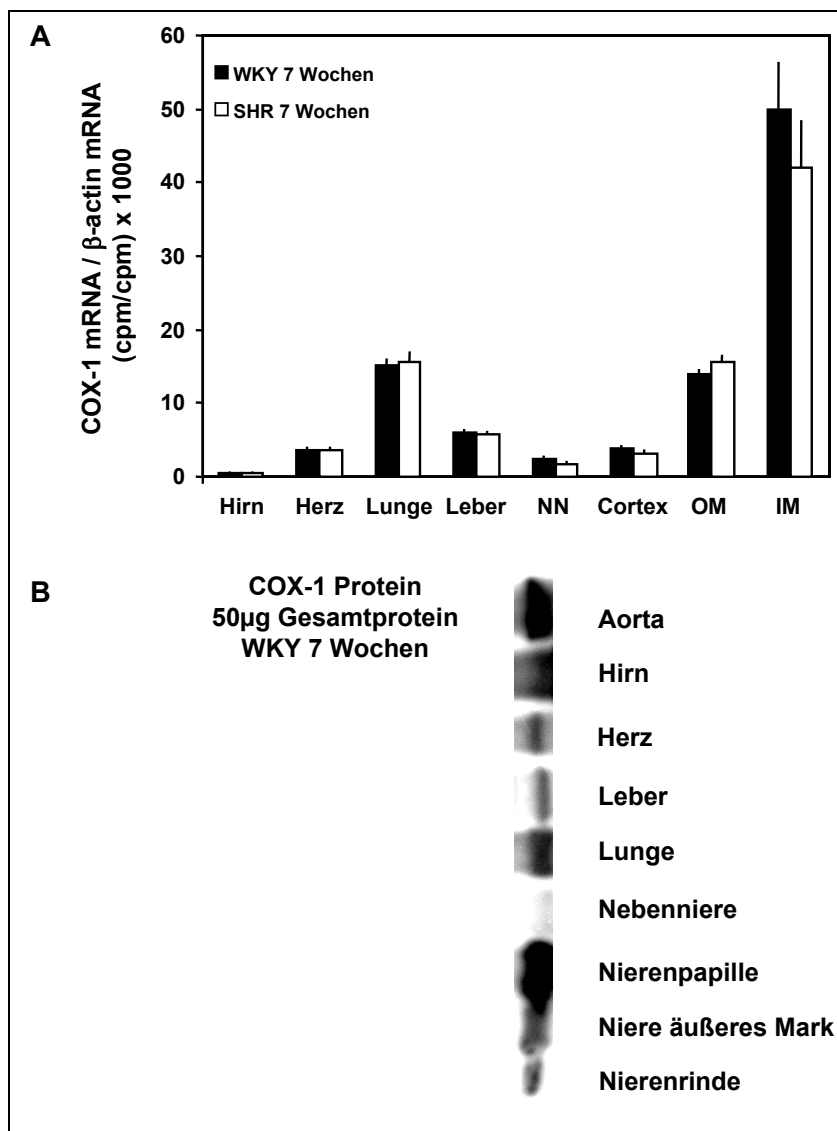
Bezüglich der Plasmaaldosteron-Konzentration ergaben sich keine altersabhängigen Veränderungen oder stamm-spezifischen Unterschiede (Abb. 18 C).



### 5.1.6 Organverteilung der COX-1 und COX-2 bei 7 Wochen alten SHR und WKY

Vor der Untersuchung altersabhängiger und stammspezifischer Veränderungen der Cyclooxygenase- und NO-Synthase-Isoenzyme in den einzelnen Nierenzonen wurde anhand der mRNA von 7 Wochen alten SHR und WKY deren Organverteilung untersucht. Zur Bestätigung der Ergebnisse der Genexpression wurde zusätzlich die zugehörige Proteinexpression der normotensiven Kontrolltiere mittels Western Blot bestimmt.

#### 5.1.6.1 Organverteilung der COX-1



#### COX-1 Genexpression

Die mRNA des konstitutiven Enzyms Cyclooxygenase 1 konnte in allen untersuchten Organen nachgewiesen werden (Abb. 19 A).

Sehr hohe COX-1 mRNA Spiegel wurden in der inneren Medulla der Niere gefunden, gefolgt von hohen Spiegeln in der äußeren Medulla der Niere und in der Lunge.

Innerhalb der Niere kommt es vom Nierencortex zur Nierenpapille hin zu einer zonalen Zunahme der detektierbaren COX-1 mRNA Menge.

In den anderen Organen, besonders im Gehirn war die COX-1 hingegen nur sehr schwach exprimiert.

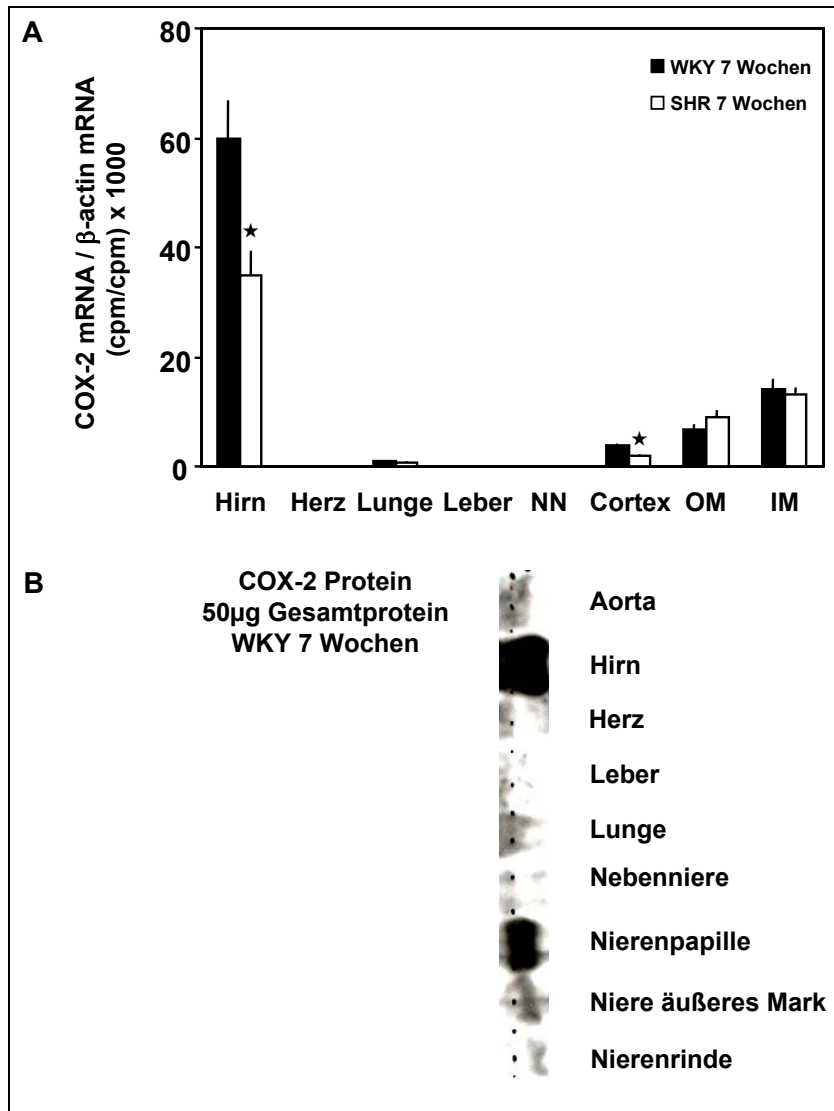
Signifikante Unterschiede zwischen SHR- und WKY-Tieren konnten nicht festgestellt werden.

**Abb. 19** Organverteilung der COX-1 bei 7 Wochen alten Tieren (n = 6, x  $\pm$  SEM).

#### COX-1 Proteinexpression

Die COX-1 Proteinexpression der WKY-Tiere (Abb. 19 B) spiegelt deutlich die Ergebnisse der mRNA Genexpression wieder. Deutlich zeigt sich auch beim Protein die zonale Zunahme vom Cortex hin zur Nierenpapille, sowie die starken Proteinbanden in Lunge und Leber, und die schwachen Signale in Nebennieren und Gehirn.

### 5.1.6.2 Organverteilung der COX-2



**Abb. 20** Organverteilung der COX-2 bei 7 Wochen alten Tieren ( $n = 6$ ,  $x \pm$  SEM;  $\star p < 0,05$  vs WKY).

### COX-2 Genexpression

Die Ergebnisse der COX-2 Genexpression der einzelnen Organe (Abb. 20 A) spiegeln die seit einiger Zeit bekannte Tatsache wieder, dass auch die COX-2 konstitutiv exprimiert wird, und zwar vor allem im Gehirn und in deutlich geringerem Ausmaß auch in den Nieren.

Mit Ausnahme der Lunge, wo nur ein schwaches Signal detektiert werden konnte, war in den weiteren Organen keine COX-2 mRNA nachweisbar.

Wie bei der COX-1 Genexpression zeigt sich auch hier deutlich die zonale Zunahme der mRNA vom Cortex zur Nierenpapille.

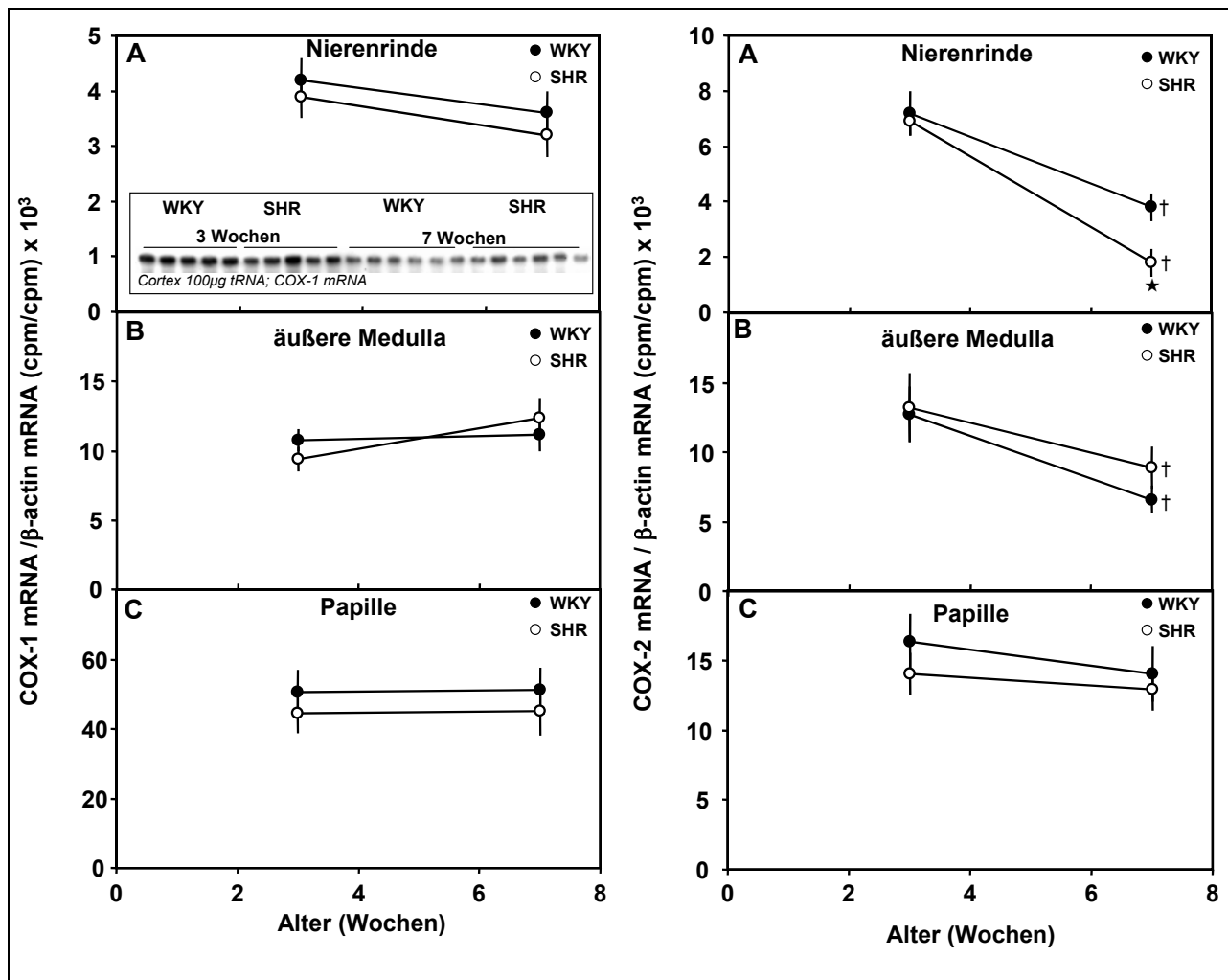
Auffallend ist die bei SH-Ratten im Vergleich zu WKY-Ratten signifikant erniedrigte Genexpression der COX-2 in Gehirn und Nierencortex.

### COX-2 Proteinexpression

Die COX-2 Proteinexpression (Abb. 20 B) der WKY-Ratten spiegelt wiederum die Ergebnisse der COX-2 Genexpression von WKY. Auch beim Protein zeigten sich die Unterschiede in den basalen COX-2 Proteinspiegeln der einzelnen Nierenzonen. Dabei war im Nierencortex fast kein COX-2 Protein nachweisbar. Entsprechend der mRNA konnten außerdem auch sehr hohe COX-2 Proteinspiegel im Gehirn gezeigt werden.

### 5.1.7 Gen- und Proteinexpression von COX-1 und COX-2 in den Nieren 3 und 7 Wochen alter SHR und WKY

#### 5.1.7.1 Genexpression der COX-1 und -2 in den Nierenzonen



**Abb. 21** COX-1 und COX-2 Genexpression in den Nierenzonen 3 und 7 Wochen alter SHR und WKY ( $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ; ★ $p < 0,05$  vs WKY ; † $p < 0,05$  vs 3 Wochen).

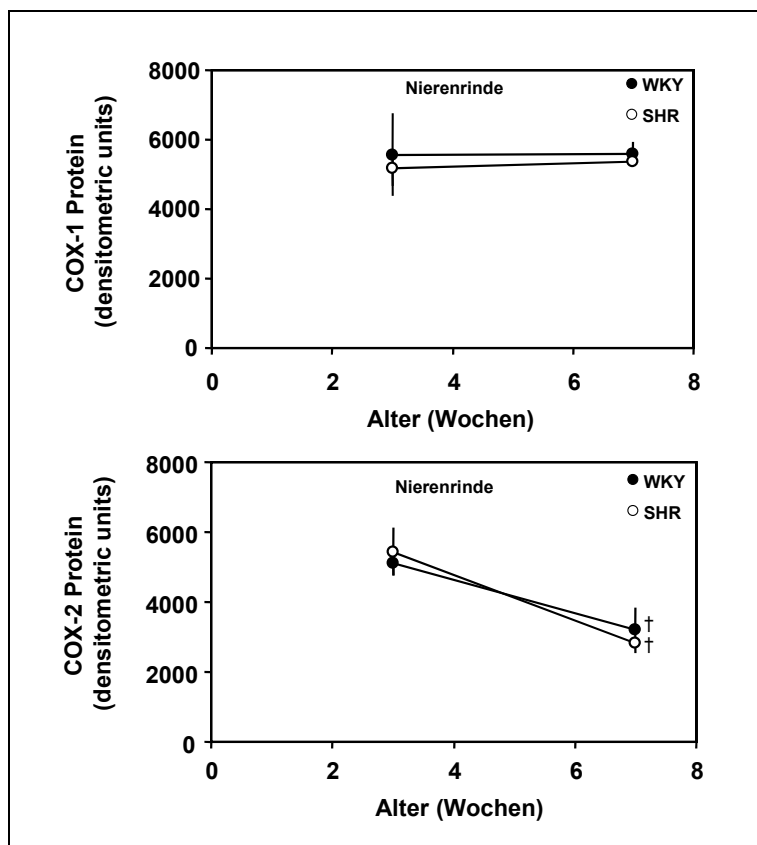
#### COX-1 Genexpression

Mit zunehmendem Alter kam es weder bei SH- noch bei WKY-Ratten zu einer signifikanten Veränderung der COX-1 Genexpression. Die basale Menge an COX-1 mRNA bei SHR entsprach dabei zu jedem Zeitpunkt und in jeder Nierenzone der von WKY.

#### COX-2 Genexpression

Bei der COX-2 Genexpression von 3 Wochen alten SHR und WKY konnten in keiner Nierenzone Unterschiede zwischen den Stämmen gefunden werden. Mit zunehmendem Alter kam es dann sowohl bei SHR, als auch bei WKY zu einer signifikanten Verringerung der basalen COX-2 mRNA Spiegel des Nierencortex und der äußeren Medulla. Die 7 Wochen alten SHR zeigten dabei im Nierencortex eine signifikant niedrigere COX-2 Genexpression als gleich alte WKY-Tiere. Die COX-2 mRNA-Spiegel der Nierenpapille waren hingegen bei beiden Stämmen identisch und veränderten sich mit zunehmendem Alter nicht.

### 5.1.7.2 Proteinexpression der COX-1 und -2 im Nierencortex



**Abb. 22** Proteinexpression von COX-1 und COX-2 in der Nierenrinde 3 und 7 Wochen alter SHR und WKY (n = 6,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ; † p<0,05 vs 3 Wochen).

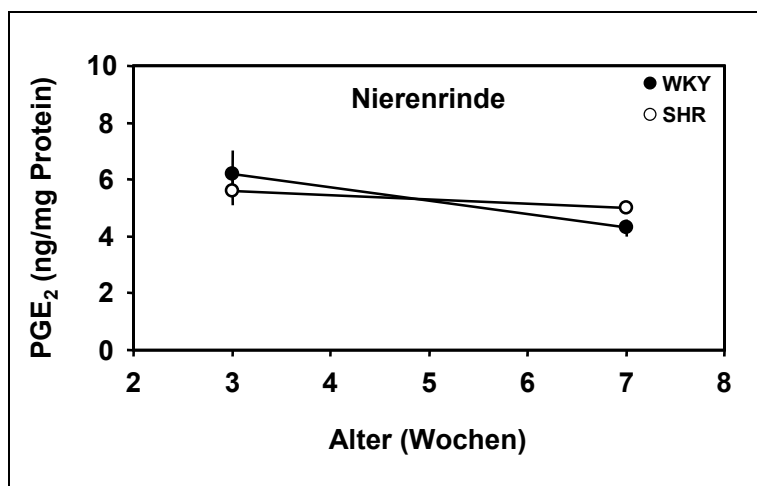
#### COX-1 Proteinexpression

Wie schon bei der COX-1 mRNA entsprachen sich auch die basalen COX-1 Proteinspiegel der Nierenrinde bei beiden Stämmen zu jedem Zeitpunkt. Die COX-1 Spiegel veränderten sich mit zunehmendem Alter nicht.

#### COX-2 Proteinexpression

Während die mRNA Expression der COX-2 des Nierencortex bei 7 Wochen alten SHR signifikant erniedrigt ist gegenüber den normotensiven Kontrolltieren, konnte bei der COX-2 Proteinexpression dieser Tiere kein Unterschied festgestellt werden.

### 5.1.8 Prostaglandin E<sub>2</sub> im Nierencortex von 3 und 7 Wochen alten SHR und WKY



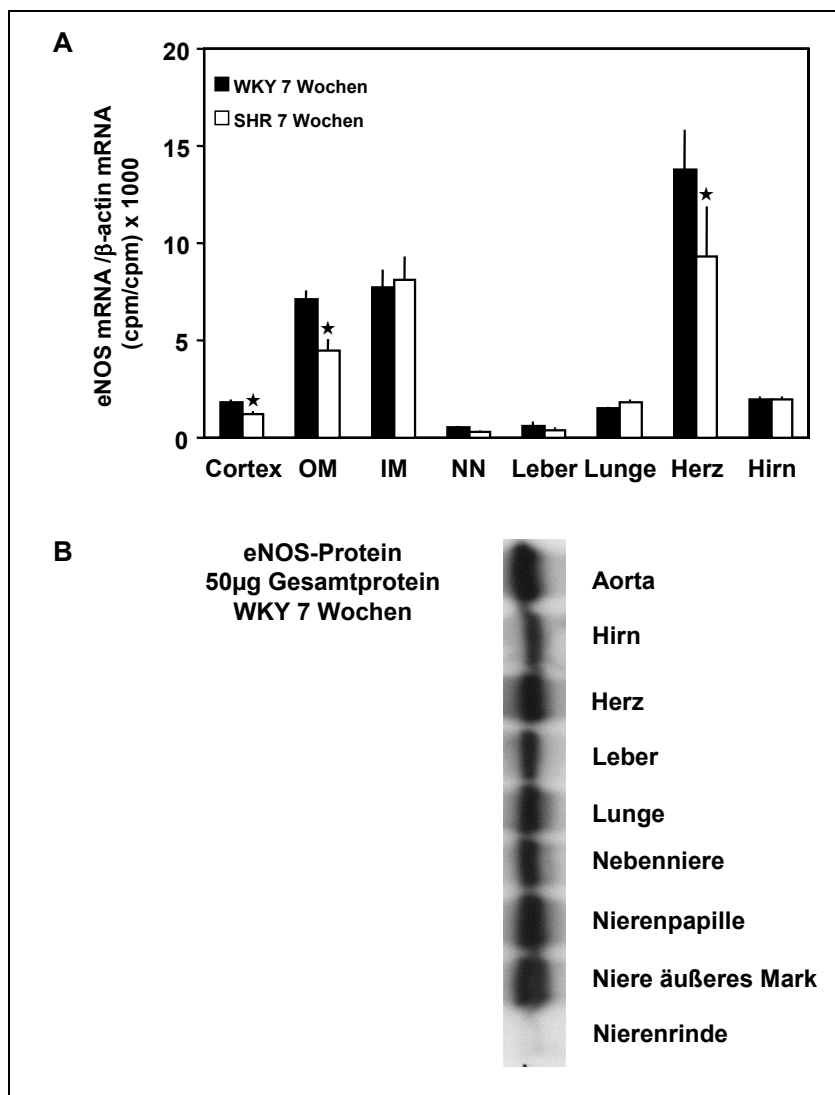
**Abb. 23** PGE<sub>2</sub> in der Nierenrinde 3 und 7 Wochen alter SHR und WKY (n = 6,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ).

Das von der Cyclooxygenase gebildete, vasodilatorische Prostaglandin E<sub>2</sub> ist als Gegenspieler des vasokonstriktorisches Prostaglandins Thromboxan A<sub>2</sub> für die Nierendurchblutung von großer Bedeutung.

Es zeigten sich bei den 3 bzw. 7 Wochen alten SH- und WKY-Ratten weder altersabhängige Veränderungen noch artspezifische Unterschiede.

## 5.1.9 Organverteilung von eNOS und nNOS bei 7 Wochen alten SHR und WKY

### 5.1.9.1 Organverteilung der eNOS



**Abb. 24** Organverteilung der eNOS bei 7 Wochen alten Tieren (n = 6,  $\bar{x} \pm$  SEM; \*p<0,05 vs WKY).

#### eNOS Genexpression

Die mRNA der endothelialen NO-Synthase konnte in allen untersuchten Organen nachgewiesen werden.

Die höchsten eNOS mRNA Spiegel lagen im Herzen vor, gefolgt von hohen Spiegeln in der inneren und äußeren Medulla der Niere.

Innerhalb der Niere kommt es, wie schon bei den Cyclooxygenase Isoenzymen beobachtet, vom Nierencortex zur inneren Medulla hin zu einer zonalen Zunahme der detektierbaren eNOS mRNA-Menge.

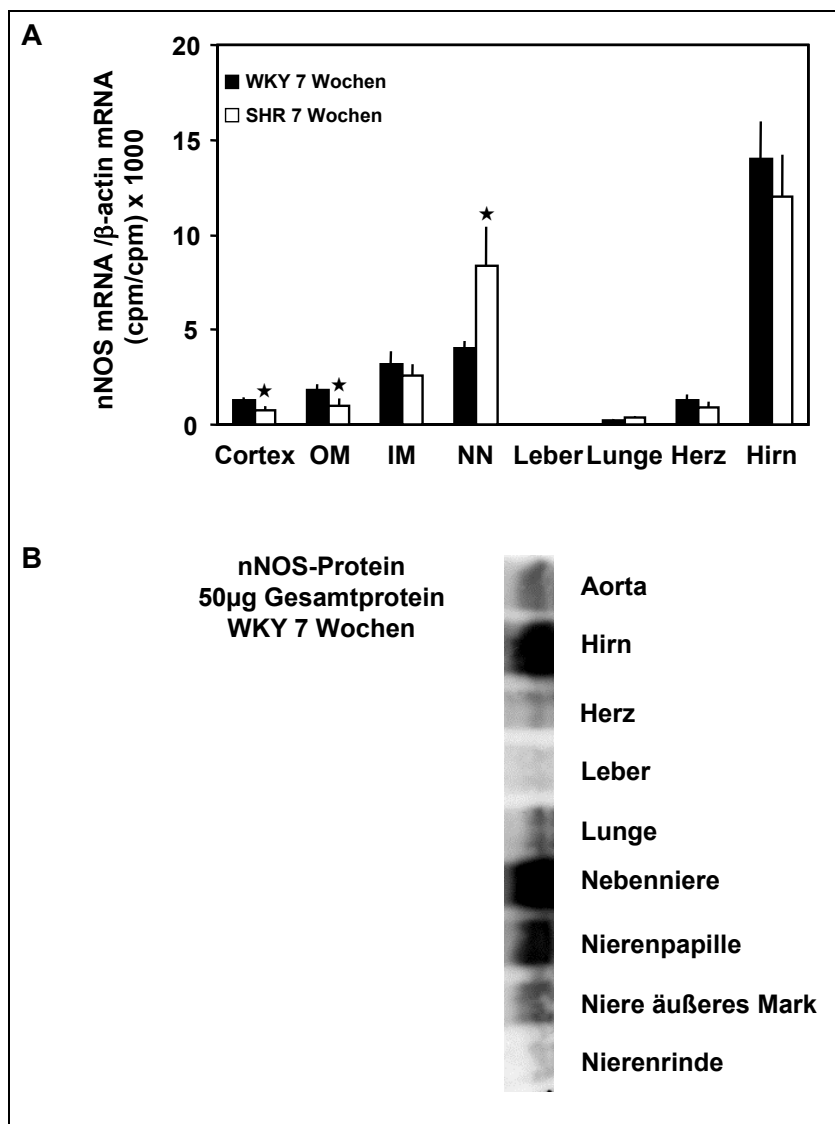
Im Cortex und den anderen Organen war die endotheliale NO-Synthase nur schwach exprimiert.

Signifikant niedrigere eNOS mRNA-Spiegel konnten im Nierencortex, im äußeren Nierenmark und im Herzen der SHR nachgewiesen werden (Abb. 24 A).

#### eNOS Proteinexpression

Die eNOS Proteinexpression der WKY-Tiere (Abb. 24 B) bestätigt die Ergebnisse der mRNA Genexpression. Deutlich zeigen sich auch beim Protein intensive Banden in Nierenpapille, äußerem Nierenmark und Herz. Im Cortex konnte hingegen kein eNOS-Protein detektiert werden.

### 5.1.9.2 Organverteilung der nNOS



**Abb. 25** Organverteilung der nNOS bei 7 Wochen alten Tieren ( $n = 6$ ,  $x \pm$  SEM;  $\star p < 0,05$  vs WKY).

### nNOS Genexpression

Mit Ausnahme der Leber wurde in allen Organen nNOS mRNA (Abb. 25 A) gefunden. Besonders große Mengen konnten im Gehirn detektiert werden.

Signifikante Unterschiede zeigten sich in einer erniedrigten nNOS Genexpression im Nierencortex und in der äußeren Medulla der SH-Ratten,

ebenso wie in einer erhöhten nNOS Genexpression in den Nebennieren der SHR.

### nNOS Proteinexpression

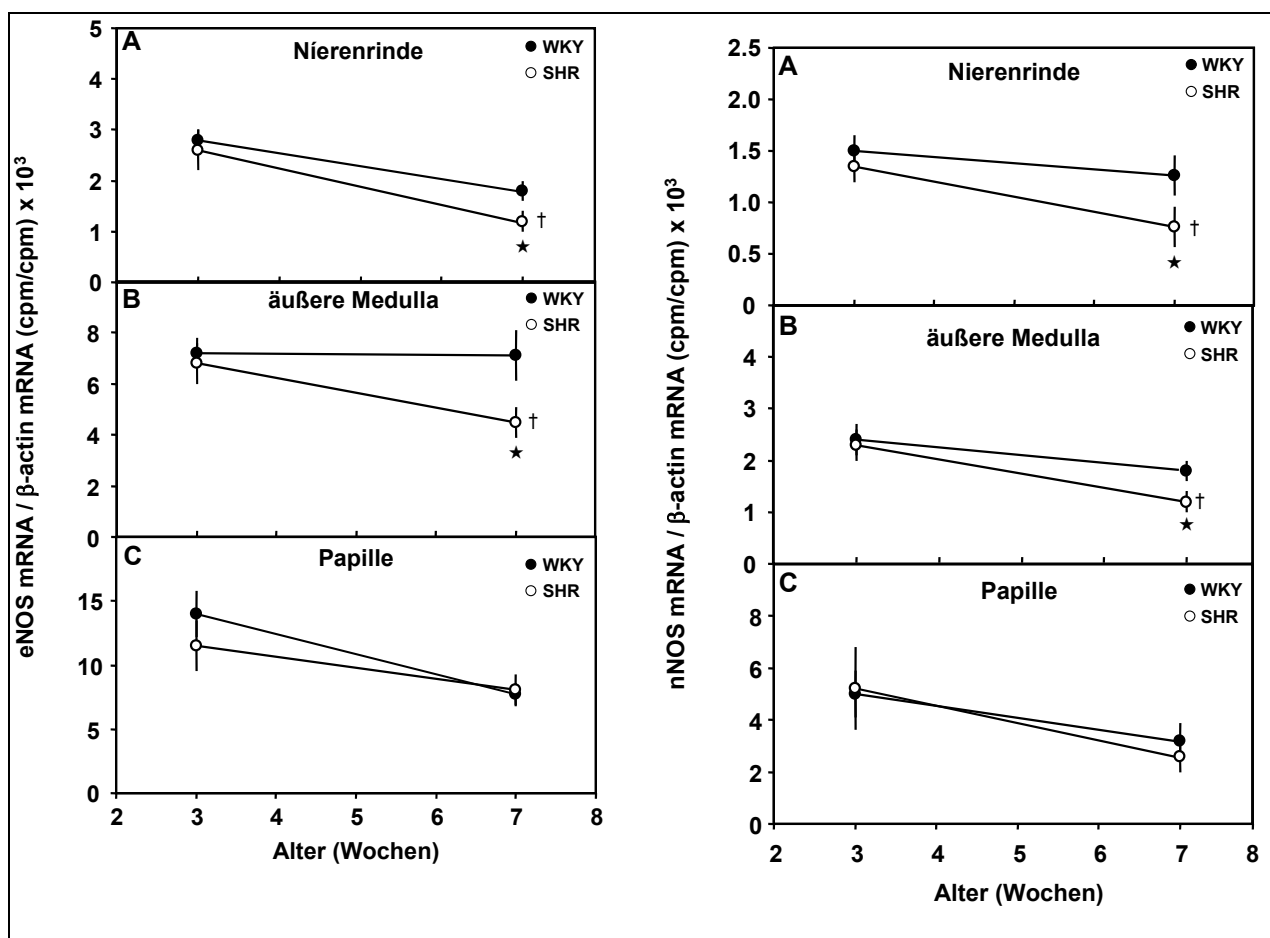
Die Ergebnisse der nNOS Proteinexpression (Abb. 25 B) stimmen mit den mRNA Daten überein. In Gehirn und Nebennieren konnten die intensivsten eNOS Proteinbanden detektiert werden. Im Gegensatz zu dem im Nierencortex nicht nachweisbaren eNOS Protein wurde im Cortex eine sehr geringe Menge an nNOS Protein gefunden. Auch konnte deutlich eine zonale Zunahme der vorhandenen nNOS Proteinmenge vom Cortex zur Nierenpapille gezeigt werden.

### 5.1.10 Gen- und Proteinexpression von eNOS und nNOS in den Nieren 3 und 7 Wochen alter SHR und WKY

In den Nieren wird NO im Bereich der juxtaglomerulären Zellen durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) des Endothels der afferenten Arteriole und von der in der Macula densa exprimierten neuronalen NO-Synthase (nNOS) gebildet.

#### 5.1.10.1 Genexpression von eNOS und nNOS in den Nierenzonen

Die Veränderungen in der Genexpression der endothelialen und neuronalen NO-Synthase (Abb. 26) entsprachen sich in der jeweiligen Nierenzone. Lediglich war die nachweisbare Menge an eNOS mRNA dabei stets größer als die der nNOS mRNA.

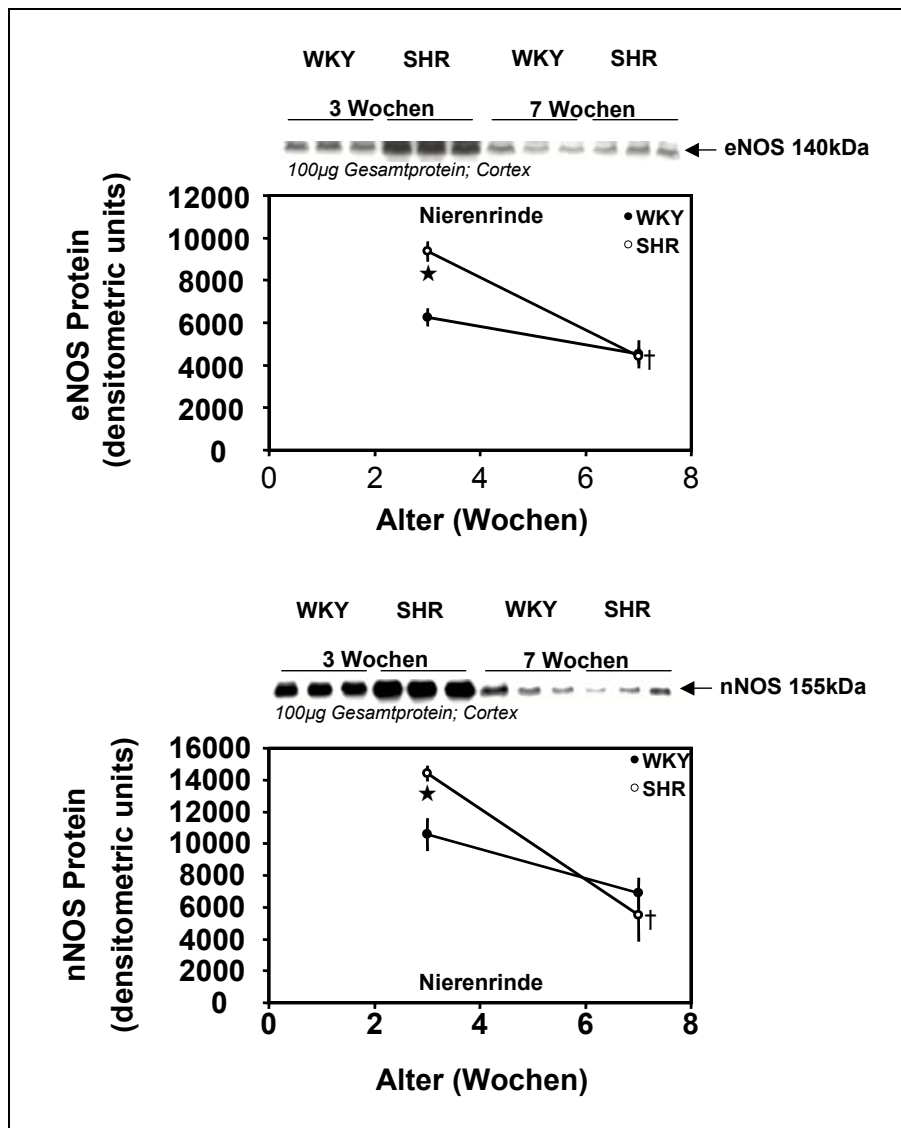


**Abb. 26** eNOS und nNOS Genexpression in den Nierenzonen 3 und 7 Wochen alter SHR und WKY ( $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ;  $\star p < 0,05$  vs WKY ;  $\dagger p < 0,05$  vs 3 Wochen).

Bei 3 Wochen alten SHR bestand in keiner Nierenzone ein signifikanter Unterschied zu WKY. 7 Wochen alte WKY zeigten gegenüber 3 Wochen alten WKY keine signifikant veränderte eNOS und nNOS mRNA Genexpression. Hingegen kam es bei 7 Wochen alten SHR in Nierenrinde und äußerer Medulla zu einer signifikanten Verringerung der mRNA beider NO-Synthasen, sowohl gegenüber 3 Wochen alten SHR, als auch gegenüber altersgleichen WKY-Tieren. In der Nierenpapille konnten weder altersabhängige noch stammspezifische Veränderungen gemessen werden.

### 5.1.10.2 Proteinexpression von eNOS und nNOS im Nierencortex

Die Ergebnisse der Proteinuntersuchung des Nierencortex (Abb. 27) unterscheiden sich auffallend von den ermittelten mRNA Daten.

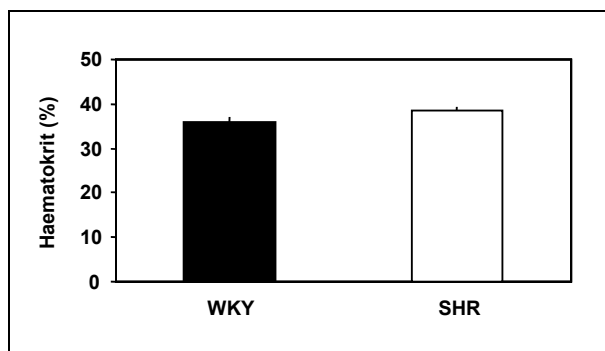


Während sich die Menge der quantifizierbaren eNOS- und nNOS mRNA des Nierencortex der 3 Wochen alten Rattenstämme nicht unterschied, waren eNOS und nNOS Protein bei 3 Wochen alten SH-Ratten signifikant erhöht gegenüber WKY.

Ebenso konnte eine signifikante Verringerung des eNOS- und nNOS Proteins nur bei 7 Wochen alten SHR nachgewiesen werden. Bei WKY-Ratten konnte entsprechend der mRNA Genexpression auch bei der Proteinexpression keine altersabhängige Veränderung festgestellt werden.

**Abb. 27** eNOS und nNOS Proteinexpression in der Nierenrinde 3 und 7 Wochen alter SHR und WKY (n = 6, x ± SEM; ★p<0,05 vs WKY ; †p<0,05 vs 3 Wochen ).

### 5.1.11 Hämatokrit



Bei den Hämatokrit-Werten wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen.

**Abb. 28** Hämatokrit bei 7 Wochen alten SHR und WKY (n = 6, x ± SEM).



### 5.1.12 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse

**Tab. 11** Übersicht der Ergebnisse zur genetischen Hypertonie.

Bedeutung der Symbole:

↔ : Keine signifikanten Unterschiede zu WKY

↑ : signifikant erhöht gegenüber WKY

↓ : signifikant erniedrigt gegenüber WKY

	SHR vs WKY
<b>Allgemeine Daten</b>	
Körpergewicht	↓ ab der 6. Lebenswoche
Wasserverbrauch	↔
Futtermittelverbrauch	↔
<b>Kardiovaskuläre Parameter</b>	
Systolischer BP	↑ ab 5. Lebenswoche
Herzfrequenz	↑ jedoch nur während der 4. und 5. Woche
Rel. Herzgewicht 7 Wochen alter Tiere	↑
β-/α-Myosin-Ratio 7 Wochen alter Tiere	↑
<b>Renale Parameter und Hämatokrit</b>	
Relatives Nierengewicht 7 Wochen alter Tiere	↔
Hämatokrit 7 Wochen alter Tiere	↔
<b>Katecholamine im Nierencortex 7 Wochen alter SHR und WKY</b>	
Adrenalin	↔
Dopamin	↔
Noradrenalin	↔

	Alter		Gene	
	WKY 7 Wochen vs WKY 3 Wochen	SHR 7 Wochen vs SHR 3 Wochen	SHR 3 Wochen vs WKY 3 Wochen	SHR 7 Wochen vs WKY 7 Wochen
<b>Renin mRNA des Nierencortex, Plasmarenin-Aktivität und Plasmaaldosteron-Aktivität</b>				
Renin mRNA	↓	↓	↓	↓
Plasmarenin	↔	↔	↔	↓
Plasmaaldosteron	↔	↔	↔	↔
<b>Cyclooxygenase 1 in den Nieren</b>				
mRNA <sub>Co,OM,IM</sub>	↔	↔	↔	↔
Protein <sub>Cortex</sub>	↔	↔	↔	↔
<b>Cyclooxygenase 2 in den Nieren</b>				
mRNA <sub>Cortex</sub>	↓	↓	↔	↓
mRNA <sub>OM</sub>	↓	↓	↔	↔
mRNA <sub>IM</sub>	↔	↔	↔	↔
Protein <sub>Cortex</sub>	↓	↓	↔	↔
<b>Prostaglandin E<sub>2</sub> im Nierencortex</b>				
PGE <sub>2</sub>	↔	↔	↔	↔
<b>eNOS- und nNOS Genexpression in den Nierenzonen</b>				
mRNA <sub>Cortex</sub>	↔	↓	↔	↓
mRNA <sub>OM</sub>	↔	↓	↔	↓
mRNA <sub>IM</sub>	↔	↔	↔	↔
<b>eNOS- und nNOS Proteinexpression im Nierencortex</b>				
Protein <sub>Cortex</sub>	↔	↓	↑	↔

	SHR vs WKY
<b>Organverteilung bei 7 Wochen alten Tieren</b>	
COX-1 mRNA	↔
COX-2 mRNA	↓ in Cortex und Gehirn von SHR
eNOS mRNA	↓ in Cortex, OM und Herz von SHR
nNOS mRNA	↓ in Cortex und OM von SHR ↑ in den Nebennieren von SHR

---

### 5.1.13 Zusammenfassung der Ergebnisse

#### 1. *Körpergewicht, Futter- und Wasserverbrauch*

---

- Trotz gleichartiger Zunahme von Futter- und Wasserverbrauch zeigten SHR ab der 6. Lebenswoche ein gegenüber WKY signifikant verringertes Körpergewicht.

#### 2. *Kardiovaskuläre Parameter*

---

- Bereits ab der 5. Lebenswoche war der Blutdruck der SHR im Vergleich zu der normotensiven WKY-Kontrolle signifikant erhöht und stieg bis zur 7. Woche weiter an.
- Die Herzfrequenz, die sich bei beiden Stämmen zur 7. Woche hin verringerte, war bei SHR lediglich während der 4. und 5. Lebenswoche signifikant erhöht.
- Des Weiteren konnte bei 7 Wochen alten SHR eine signifikante Zunahme des relativen Herzgewichts und der  $\beta$ -/ $\alpha$ -Myosin-Ratio nachgewiesen werden.

#### 3. *Renale Parameter und Hämatokrit*

---

- Das relative Nierengewicht und der Hämatokrit der SHR unterschieden sich nicht von dem der Kontrolle.

#### 4. *Katecholamine im Nierencortex*

---

- Es konnte bei keinem der 7 Wochen alten Rattenstämme eine gesteigerte Aktivität des sympathischen Nervensystems im Nierencortex nachgewiesen werden. Die Adrenalin-, Noradrenalin- und Dopamin-Spiegel unterschieden sich bei den 7 Wochen alten Tieren nicht.

#### 5. *Renin Genexpression, Plasmarenin und Plasmaaldosteron*

---

- Die basale Renin Genexpression nahm bei beiden Stämmen mit zunehmendem Alter ab.
- SHR hatten zu jedem Zeitpunkt signifikant niedrigere Renin mRNA Spiegel.
- In der 7. Lebenswoche war die Plasmarenin-Aktivität bei SHR niedriger als bei gleichaltrigen WKY Ratten.
- Bei den Plasmaaldosteron-Spiegeln gab es keine signifikanten Unterschiede.

#### 6. *Organverteilung der Cyclooxygenase-Isoenzyme bei 7 Wochen alten SHR und WKY*

---

- mRNA und Protein der Cyclooxygenase 1 konnte ohne stammspezifische Unterschiede in allen untersuchten Organen nachgewiesen werden.
- Dabei zeigte sich eine Verringerung der COX-1 Expression in folgender Reihenfolge: IM > Lunge = OM > Leber > Herz = Cortex > Nebenniere > Hirn.
- Eine Gen- und Proteinexpression der Cyclooxygenase 2 wurde hingegen lediglich in Gehirn, Niere und Lunge festgestellt:
- COX-2 Expression: Hirn >>> IM > OM > Cortex > Lunge.
- Bei 7 Wochen alten SHR waren die COX-2 mRNA Spiegel in Gehirn und Cortex signifikant niedriger als bei altersgleichen WKY.
- Innerhalb der Nieren zeigte sich deutlich eine zonale Zunahme der Gen- und Proteinexpression beider Enzyme vom Cortex hin zur inneren Medulla.

---

## **7. Gen- und Proteinexpression der Cyclooxygenase-Isoenzyme in den Nieren**

---

- Mit zunehmendem Alter kam es weder bei SH- noch bei WKY-Ratten zu einer signifikanten Veränderung der Gen- und Proteinexpression der COX-1.
- Die COX-1 Expression bei SHR entsprach zu jedem Zeitpunkt der von WKY.
- Mit zunehmendem Alter zeigte sich bei beiden Stämmen eine signifikante Verringerung der COX-2 mRNA in Nierenrinde und äußerer Medulla bei unveränderter COX-2 Expression der inneren Medulla.
- Entsprechend war auch das COX-2 Protein des Nierencortex bei 7 Wochen alten Tieren signifikant niedriger als bei 3 Wochen alten Tieren des jeweiligen Stammes.
- Während die COX-2 Genexpression im Nierencortex bei 7 Wochen alten SHR signifikant geringer war als bei WKY gleichen Alters, unterschied sich die Proteinexpression beider Stämme hingegen zu keinem Zeitpunkt.

---

## **8. Prostaglandin E<sub>2</sub> in den Nieren**

---

- Es waren keine altersabhängigen oder artspezifischen Unterschiede in den Prostaglandin E<sub>2</sub> Spiegeln des Nierencortex festzustellen.

---

## **9. Organverteilung von eNOS und nNOS bei 7 Wochen alten SHR und WKY**

---

- Die mRNA der endothelialen NO-Synthase konnte in allen untersuchten Organen nachgewiesen werden: Herz > IM > OM > Cortex = Hirn = Lunge > Leber = Nebenniere.
- Die eNOS Proteinexpression war mit Ausnahme des Nierencortex ebenfalls in allen Organen nachweisbar.
- Bei 7 Wochen alten SHR zeigten sich in Herz, OM und Cortex signifikant niedrigere eNOS mRNA Spiegel als bei gleichaltrigen WKY.
- Eine Genexpression der neuronalen NO-Synthase konnte mit Ausnahme der Leber ebenfalls in allen Organen nachgewiesen werden.
- Während die nNOS mRNA in Cortex und OM bei SHR signifikant niedriger war, konnte in den Nebennieren signifikant höhere nNOS mRNA Spiegel detektiert werden.
- Die eNOS Proteinexpression der WKY-Tiere bestätigt die mRNA Ergebnisse.
- Innerhalb der Niere kommt es, wie schon bei den Cyclooxygenase-Isoenzymen beobachtet, vom Nierencortex zur Nierenpapille hin zu einer zonalen Zunahme der detektierbaren e- und nNOS Gen- und Proteinexpression.

---

## **10. Gen- und Proteinexpression von eNOS und nNOS in den Nieren**

---

- Die Genexpression von endothelialer und neuronaler NO-Synthase unterlag in der jeweiligen Nierenzone einer gleichartigen Veränderung.
- Die e- und nNOS mRNA Spiegel 3 Wochen alter Tiere waren in allen Nierenzonen identisch.
- In Nierenrinde und äußerer Medulla zeigten sich bei 3 und 7 Wochen alten WKY keine signifikanten Unterschiede.
- Bei 7 Wochen alten SHR kam es hingegen in beiden Zonen zu einer signifikanten Verringerung der eNOS- und nNOS mRNA Spiegel gegenüber 3 Wochen alten SHR und gegenüber 7 Wochen alten WKY.

- In der inneren Medulla konnten weder altersabhängige noch stammspezifische Unterschiede gemessen werden.
- Wie bei der mRNA zeigte sich eine altersabhängige Reduktion der renokortikalen e- und nNOS Proteinmenge nur bei SH-Ratten.
- Im Gegensatz zur mRNA war hierbei jedoch das e- und nNOS Protein der 3 Wochen alten SHR stärker exprimiert als dasjenige der gleichaltrigen WKY.
- Bei 7 Wochen alten Tieren waren die Proteinmengen gleich.

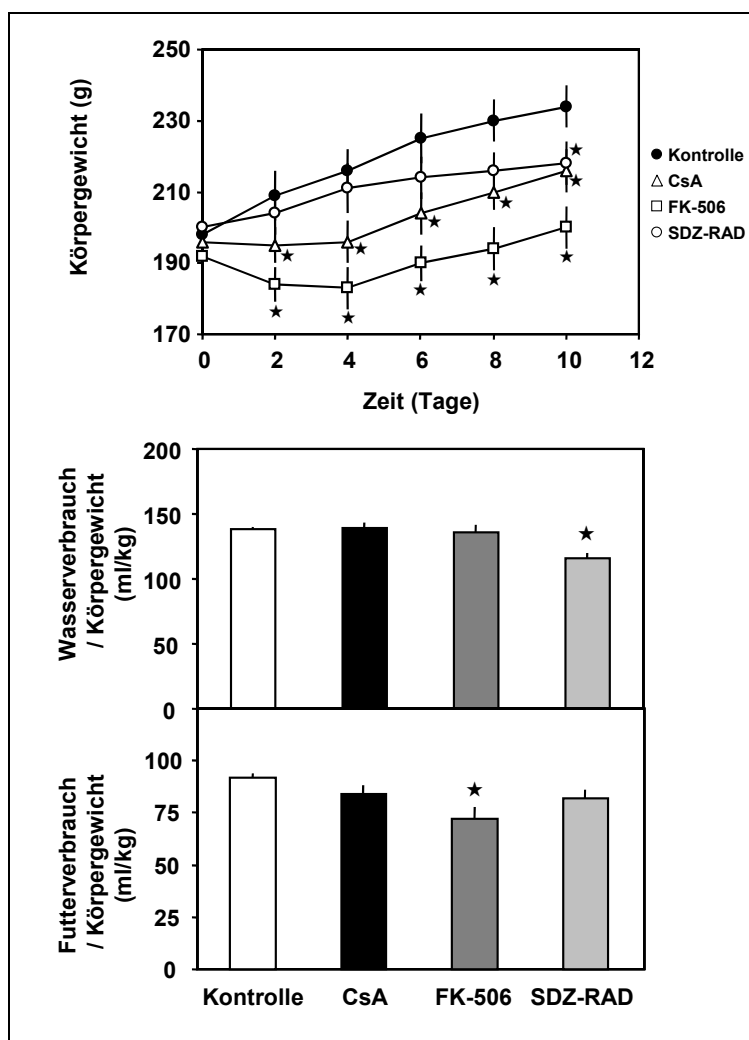
## 5.2 Immunsuppressiva-induzierte Hypertonie: Calcineurin-Inhibitoren versus mTOR-Hemmer

### 5.2.1 Versuchsmodell

Im zweiten Teil der Dissertation wurde die beginnende, Immunsuppressiva-induzierte, sekundäre Hypertonie untersucht. Dazu wurde 6 Wochen alten, männliche WKY-Ratten für 10 Tage die Immunsuppressiva Cyclosporin A (15mg/kg/Tag), Tacrolimus (FK506, 5mg/kg/Tag) und das ebenfalls immunsuppressive Rapamycin-Derivat SDZ-RAD (1mg/kg/Tag) per Schlundsonde oral verabreicht.

### 5.2.2 Entwicklung von Körpergewicht, Futter- und Wasserverbrauch

Das Körpergewicht der Kontrollgruppe stieg während des zehntägigen Behandlungszeitraums nahezu linear an. Im Gegensatz hierzu war das Gewicht der Tiere der Cyclosporin- und der Tacrolimus-Gruppe zu jedem Zeitpunkt signifikant niedriger.



**Abb. 29** Entwicklung von Körpergewicht, Futter- und Wasserverbrauch bei Immunsuppression ( $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ;  $\star p < 0,05$  vs Kontrolle).

Während es bei Cyclosporin in den ersten 4 Tagen zu keiner Gewichtsveränderung kam, verloren die Tacrolimus-Tiere in diesem Zeitraum an Gewicht. Bei beiden Gruppen folgte dann ab dem 4. Behandlungstag zu eine Gewichtszunahme.

Innerhalb der SDZ-RAD-Gruppe kam es in den ersten 9 Tagen zu einer Erhöhung des Körpergewichts. Am 10. Behandlungstag zeigten jedoch alle Gruppen ein signifikant niedrigeres Gewicht als die Kontrolltiere. Hierbei hatten die Cyclosporin- und die SDZ-RAD-Gruppe nahezu gleiches Körpergewicht. Das Gewicht der Tacrolimus-Gruppe war hingegen nach wie vor stark erniedrigt.

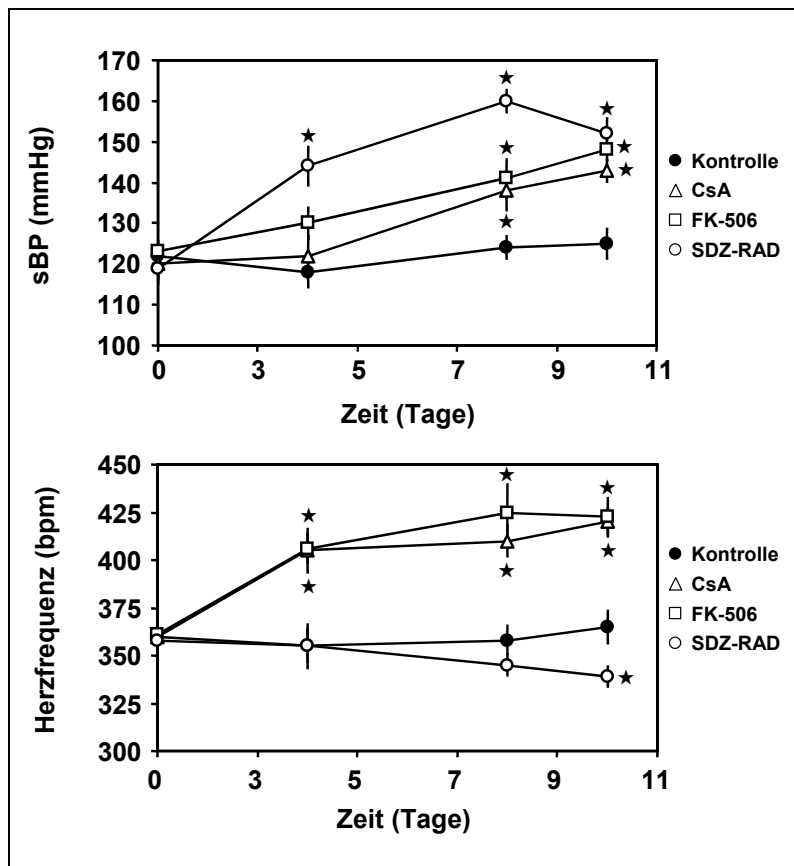
Entsprechend der geringsten Körpergewichtszunahme zeigten nur die mit Tacrolimus behandelten Tiere einen gegenüber den Kontrolltieren signifikant verringerten Futterverbrauch.

Der tägliche Bedarf an Wasser war nur bei den SDZ-RAD-Tieren erniedrigt.

## 5.2.3 Beeinflussung kardiovaskulärer Parameter durch Immunsuppressiva

### 5.2.3.1 Systolischer Blutdruck und Herzfrequenz

Nach zehntägiger Medikation konnte in allen Verumgruppen ein gegenüber den Kontrolltieren signifikant erhöhter Blutdruck festgestellt werden (Tab. 12).



**Abb. 30** Beeinflussung von Blutdruck und Herzfrequenz durch Immunsuppressiva (n = 6, x ± SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle).

Die mit Cyclosporin A und Tacrolimus behandelten Tiere zeigten bei allen Messungen eine signifikant erhöhte Herzfrequenz. Das Ausmaß der Erhöhung war bei Tacrolimus am stärksten.

Auffallend ist im Vergleich hierzu, dass sich die Herzfrequenz unter SDZ-RAD-Behandlung lediglich am 10. Tag durch eine signifikante Verringerung gegenüber der Kontrollgruppe von dieser unterscheidet. Dies könnte auf eine kompensatorische Gegenregulation des hohen Blutdrucks hindeuten.

10. Behandlungstag	Kontrolle	Cyclosporin A	Tacrolimus	SDZ-RAD
Blutdruck ± SEM (mmHg)	125 ± 1,6	142,5 ± 2,8	148 ± 2,5	152,5 ± 4,6
Herzfrequenz ± SEM (bpm)	364 ± 9,3	420 ± 8,2	428 ± 12,8	337 ± 3,3

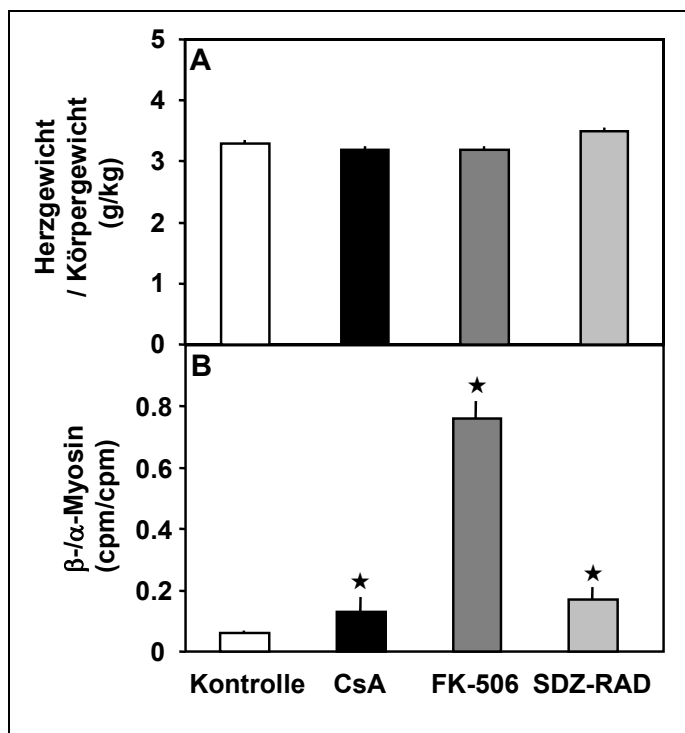
**Tab. 12** Blutdruck und Herzfrequenz nach 10-tägiger Immunsuppression.

Während der Blutdruckanstieg bei den Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus erst ab dem 8. Behandlungstag signifikant war,

zeigten sich bei den Tieren der SDZ-RAD-Gruppe (mTOR-Hemmer) überraschender Weise bereits am 4. Tag deutlich erhöhte Werte.

Nach Erreichen eines Blutdruck-Maximums von 160 mmHg am 8. Behandlungstag, sank der systolische Blutdruck in der SDZ-RAD-Gruppe zum 10. Tag hin wieder ab, war jedoch von allen 3 Verumgruppen gegenüber Placebo am stärksten signifikant erhöht.

Während des 10-tägigen Behandlungszeitraumes zeigten sich auch bei der Herzfrequenz deutliche Unterschiede zur Kontrollgruppe.



**Abb. 31** Beeinflussung von relativem Herzgewicht (A) und  $\beta$ -/ $\alpha$ -Myosin-Ratio im Herzen (B) durch Immunsuppressiva (n = 6,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ; ★p<0,05 vs Kontrolle).

### 5.2.3.2 Relatives Herzgewicht

Bezüglich des relativen Herzgewichts konnte nach 10-tägiger Behandlung in keiner der Verumgruppen ein Unterschied zur Kontrollgruppe festgestellt werden.

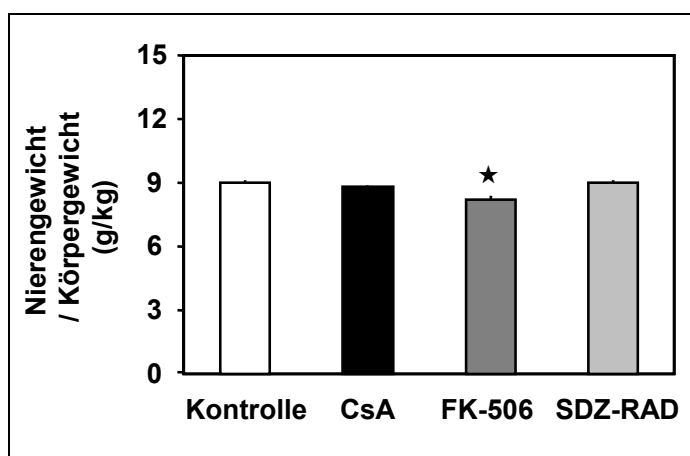
### 5.2.3.3 Veränderung der $\beta$ -/ $\alpha$ -Myosin-Ratio im Herzen

Hingegen war die Myosin-Ratio, verglichen mit der Myosin-Ratio der Placebo-Tiere, sowohl bei Calcineurinals auch bei mTOR-Hemmung signifikant erhöht. CsA und SDZ-RAD steigerten die Ratio um das Doppelte, bzw. um das fast Dreifache. Bei FK506, welches auch die stärkste Herzfrequenzerhöhung verursachte, kam es zu einer nahezu achtfachen Erhöhung dieses Parameters.

## 5.2.4 Beeinflussung renaler Parameter durch Immunsuppressiva

### 5.2.4.1 Relatives Nierengewicht

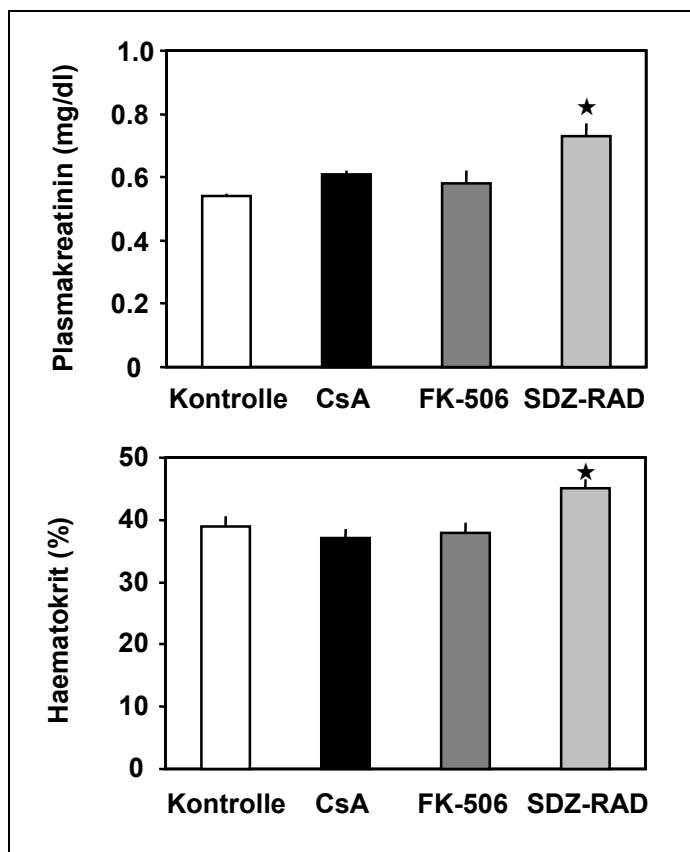
Nach zehntägiger Applikation von Verum und Placebo kam es in der Tacrolimus-Gruppe, der Gruppe mit dem geringsten Körpergewicht, zu einer signifikanten Erniedrigung des relativen Nierengewichts.



**Abb. 32** Beeinflussung des relativen Nierengewichts durch Immunsuppressiva (n = 6,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ; ★p<0,05 vs Kontrolle).



### 5.2.4.2 Plasmakreatinin und Hämatokrit



Als Parameter der Nierenfunktion wurde das Plasmakreatinin bestimmt. Auffallenderweise war das Plasmakreatinin signifikant erhöht in der SDZ-RAD-Gruppe. Bei dieser hatte sich als einziger Gruppe gleichzeitig ein verringerter Wasserverbrauch gezeigt.

Des Weiteren konnte in dieser Gruppe zusätzlich eine signifikante Erhöhung des Hämatokrits nachgewiesen werden. Bei den Cyclosporin- und Tacrolimus-Tieren entsprach der Anteil zellulärer Bestandteile im Blut hingegen dem der Kontrolltiere.

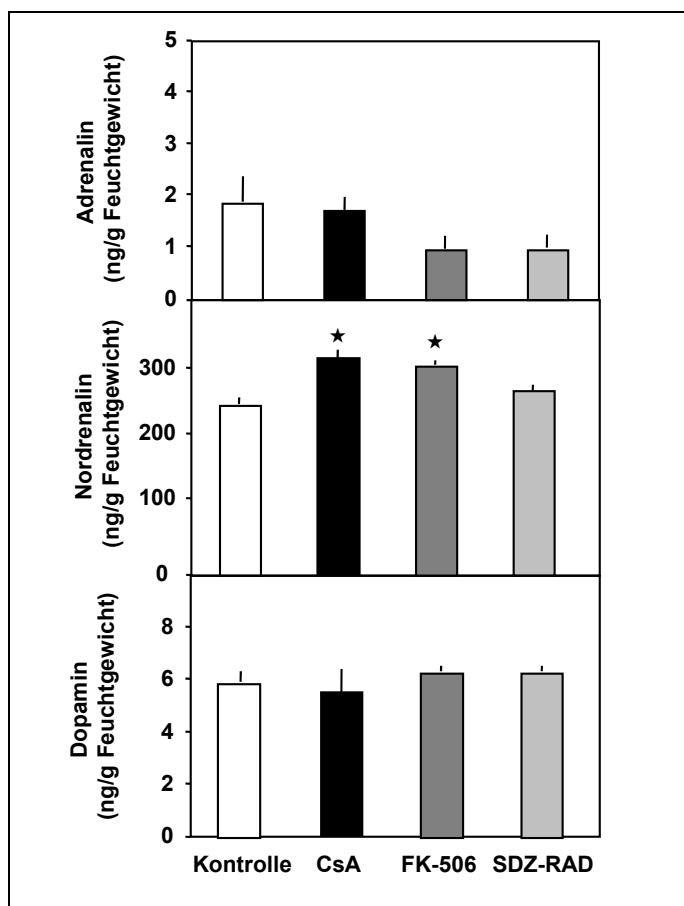
**Abb. 33** Beeinflussung von Plasmakreatinin und Hämatokrit durch Immunsuppressiva (n = 6, x ± SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle).

### 5.2.4.3 Katecholamine in der Nierenrinde

Bei der Untersuchung der Katecholamine des Nierencortex wurden für alle 3 Immunsuppressiva nur sehr geringe, sich nicht von der Kontrollgruppe unterscheidende, Adrenalin- und Dopamin-Konzentrationen gemessen.

Interessanter Weise kam es jedoch unter Behandlung mit den Calcineurininhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus zu erhöhten Noradrenalin-Spiegeln in der Nierenrinde.

Der mTOR-Hemmer SDZ-RAD hatte auch auf die Noradrenalin-Konzentration der Nierenrinde keinen Effekt.



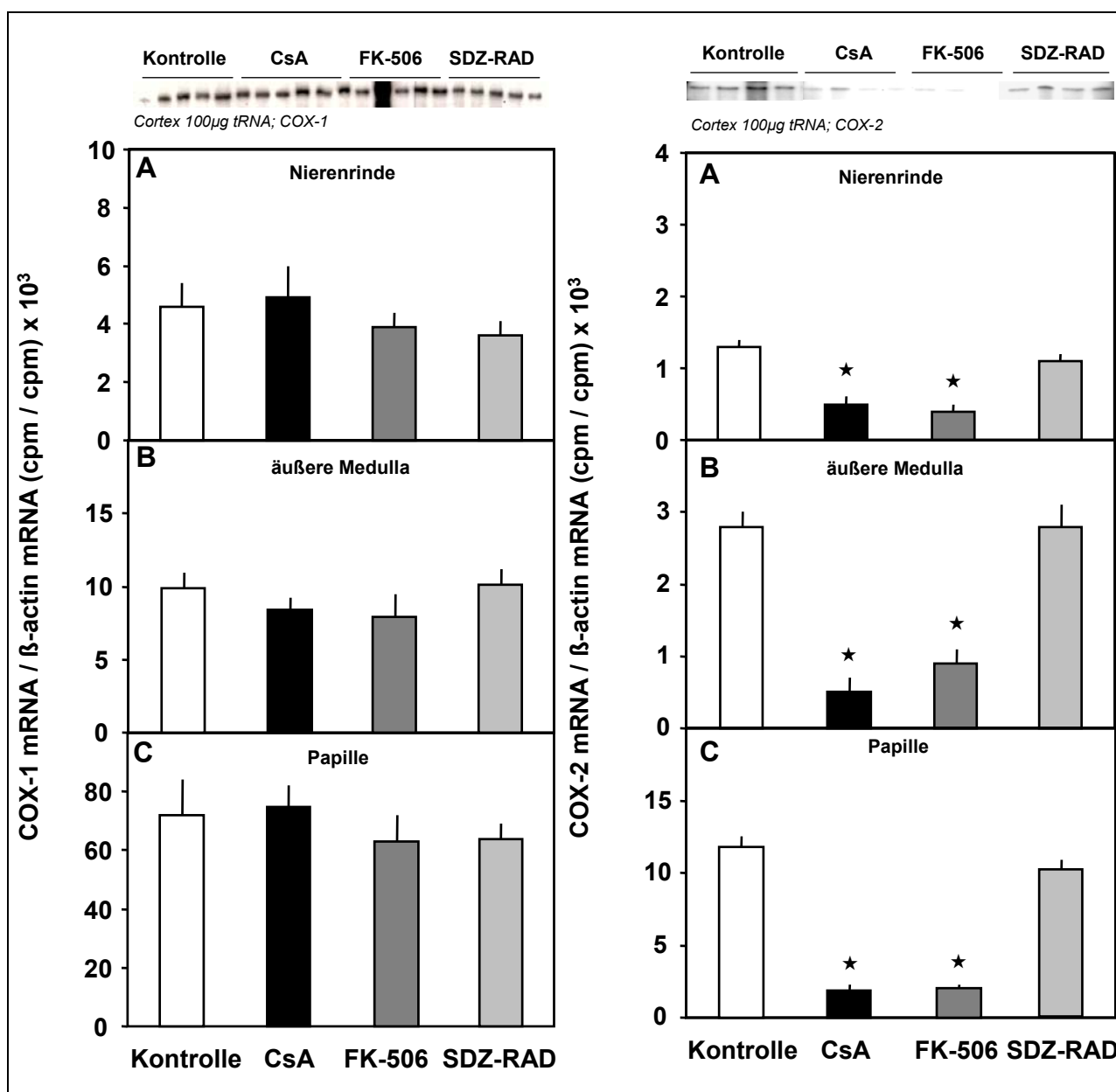
**Abb. 34** Beeinflussung der Katecholamine Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin im Nierencortex durch Immunsuppressiva (n = 6, x ± SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle).

## 5.2.5 Einfluss der Immunsuppressiva auf die Gen- und Proteinexpression der Cyclooxygenase-Isoenzyme der Nieren

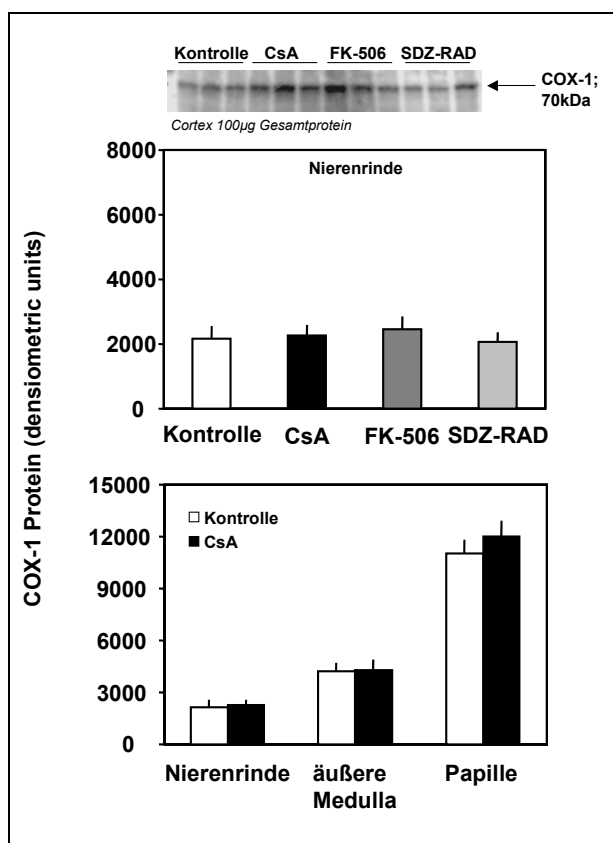
### 5.2.5.1 Genexpression von COX-1 und COX-2 in den Nierenzonen

Die mRNA Genexpression der Cyclooxygenase 1 wurde durch die zehntägige Medikation nicht beeinflusst. Es zeigte sich die typische zonale Zunahme der COX-1 mRNA von der Nierenrinde hin zur Nierenpapille.

Im Gegensatz zu der unveränderten Genexpression der Cyclooxygenase 1 kam es bei Behandlung mit den Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus in allen Nierenzonen zu einer bemerkenswerten Reduktion der basalen COX-2 mRNA Spiegel. Der mTOR-Hemmer SDZ-RAD hatte keinen Einfluss auf die basale COX-2 Genexpression. Der Gradient der COX-2 mRNA vom Nierencortex hin zur inneren Medulla zeigte sich erneut deutlich.



### 5.2.5.2 Proteinexpression von COX-1 und COX-2 in den Nieren



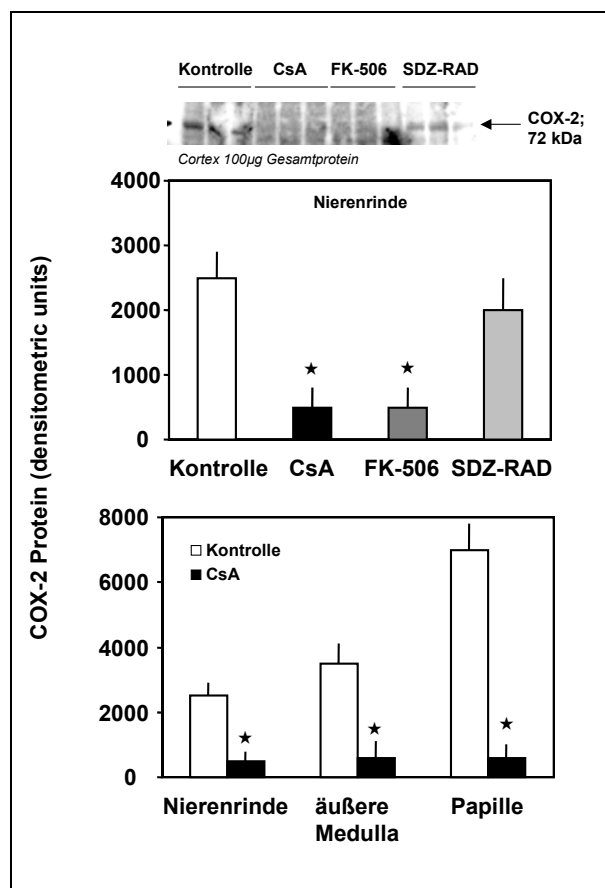
### COX-2 Proteinexpression im Nierencortex

Entsprechend den Ergebnissen der Genexpression wurde die Proteinexpression des Cyclooxygenase 2 Isoenzyms nur in den Nierenrinden der mit Calcineurin-Inhibitoren behandelten Tiere verringert. Die renokortikale Proteinexpression unter SDZ-RAD unterschied sich hingegen nicht signifikant von der Proteinexpression der Kontrolltiere.

### COX-2 Proteinexpression der Nierenzonen nach Cyclosporin A Behandlung

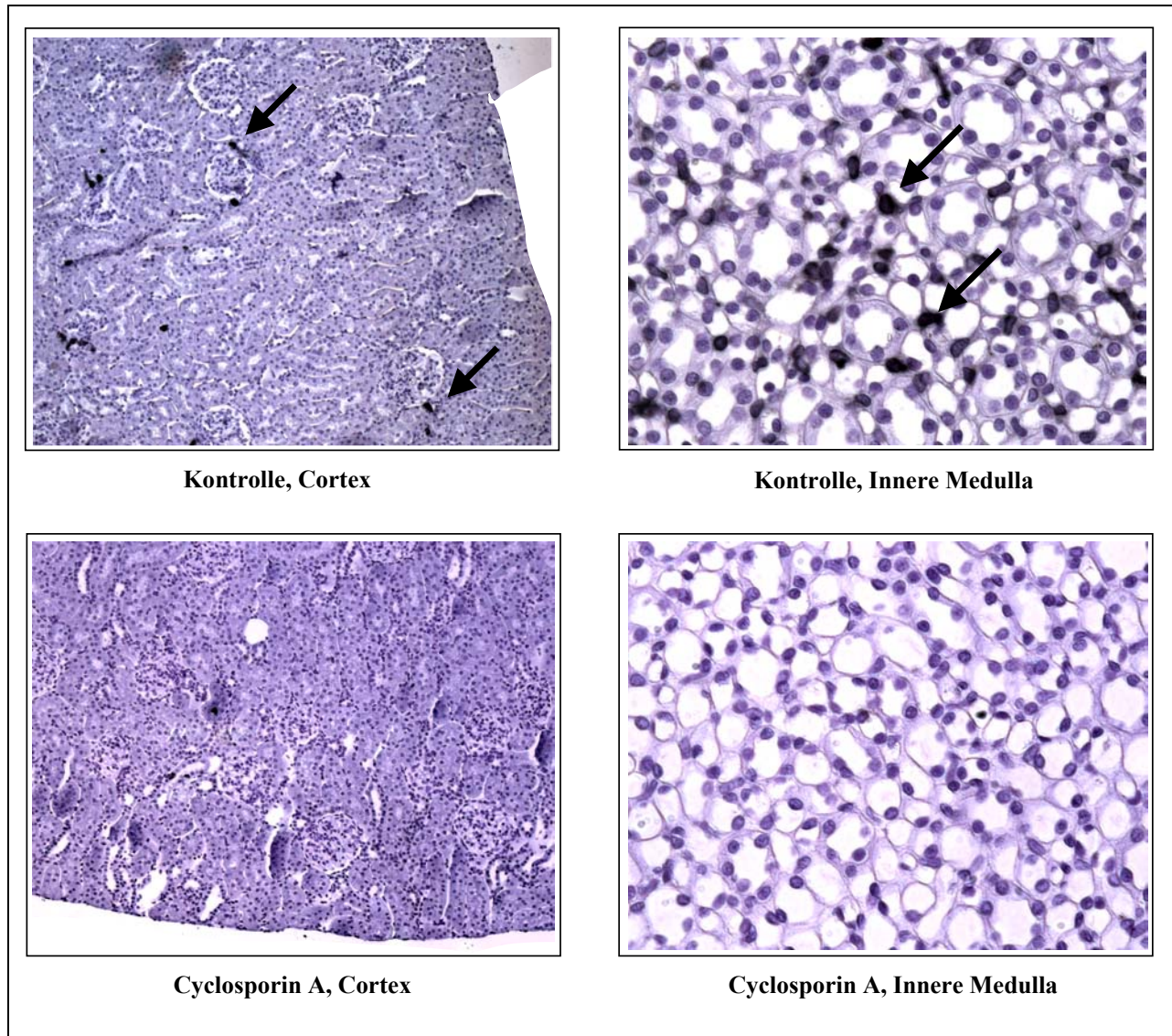
Die ergänzende Untersuchung der Nierenzonen der mit Cyclosporin A behandelten Tiere zeigte deutlich, dass es sowohl im Nierencortex als auch in der inneren und der äußeren Medulla zu einer der mRNA Genexpression entsprechenden Reduktion der basalen Proteinexpression der Cyclooxygenase 2 kommt.

**Abb. 37** COX-2 Proteinexpression bei Immunsuppression (n = 6, x ± SEM ; ★p<0,05 vs Kontrolle).



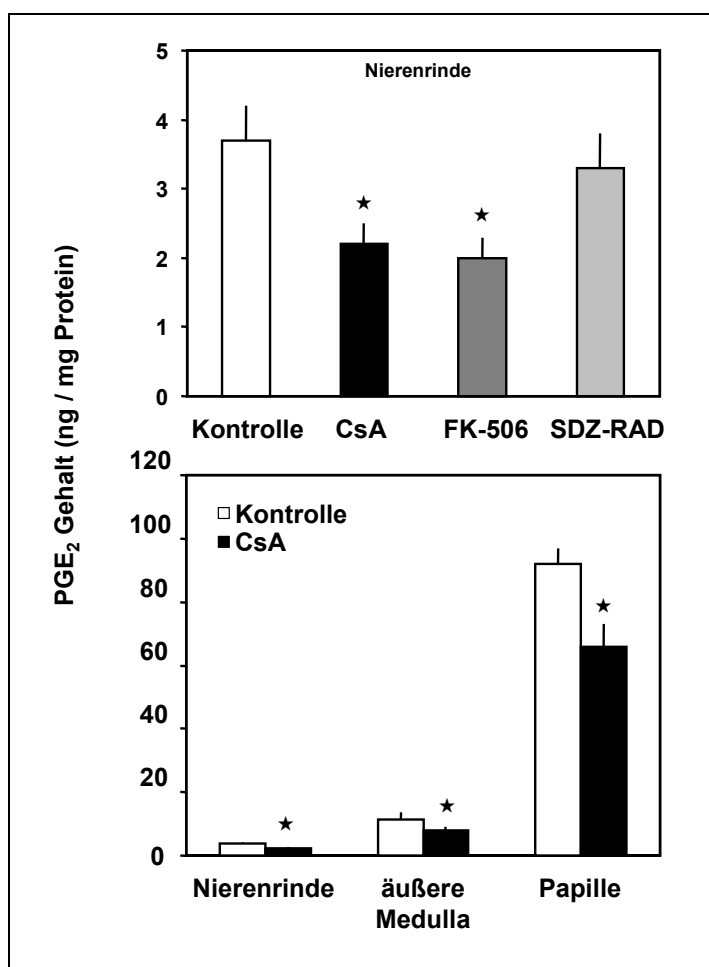
### 5.2.5.3 Immunhistochemische Färbungen der COX-2 in Papille und Cortex der Niere

Die Ergebnisse der COX-2 Gen- und Proteinexpression werden durch eine entsprechende Verringerung der COX-2 Immunoreaktivität sowohl in den TALH („thick ascending limb of Henle“)/Macula densa Strukturen als auch in den interstitiellen Zellen der inneren Medulla bestätigt.



**Abb. 38** Immunhistochemische Färbung der COX-2 in Nierenpapille und Nierencortex.

### 5.2.6 Einfluss der Immunsuppression auf Prostaglandin E<sub>2</sub> in den Nieren



**Abb. 39** PGE<sub>2</sub> Gehalt der Nieren bei Immunsuppression (n = 6, x ± SEM ; ★p<0,05 vs Kontrolle).

#### Prostaglandin E<sub>2</sub> im Nierencortex

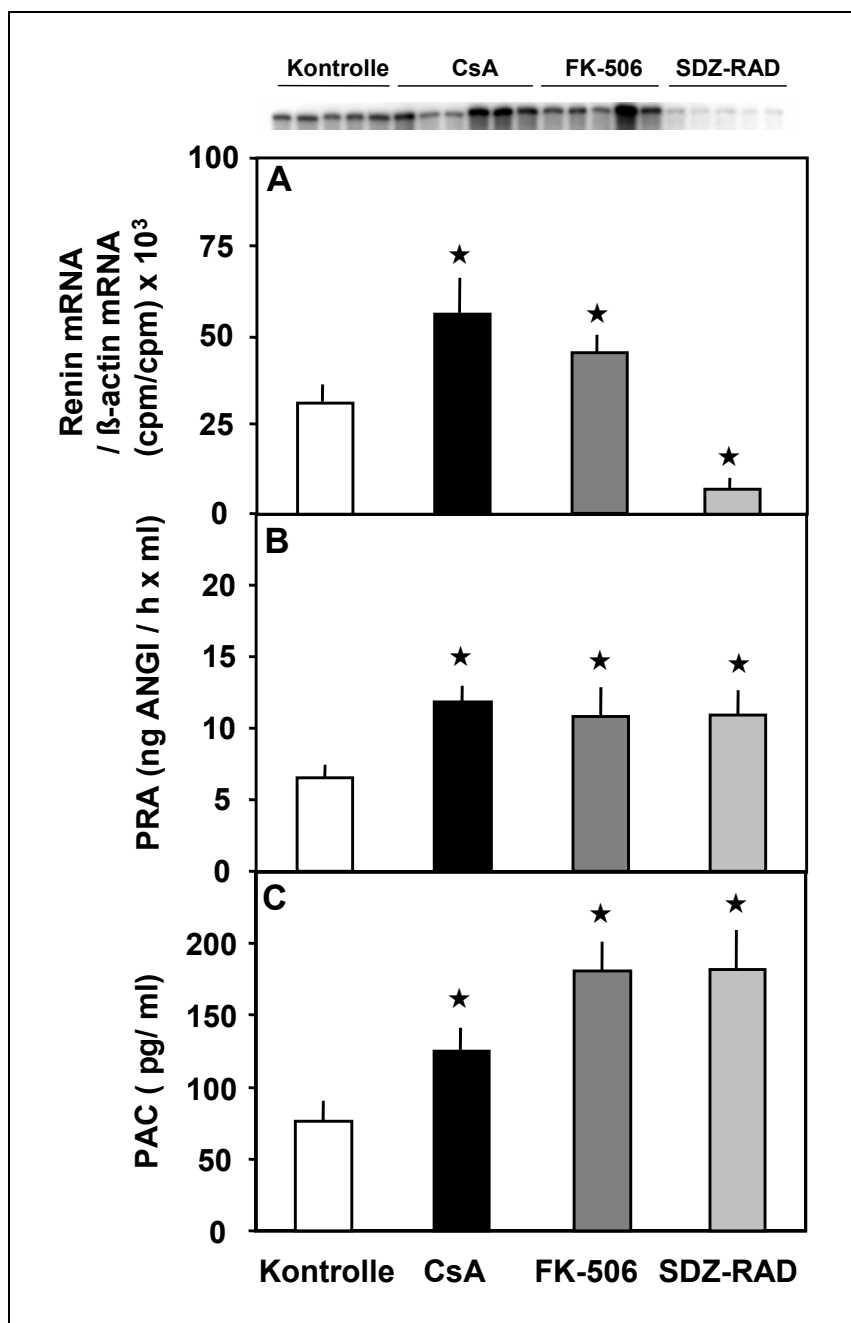
In Übereinstimmung mit der, unter Calcineurin-Hemmung zu beobachtenden, Reduktion der basalen COX-2 Gen- und Proteinexpression kam es nur bei Cyclosporin A und Tacrolimus zu einer deutlichen Abnahme der renokortikalen PGE<sub>2</sub> Spiegel.

#### Prostaglandin E<sub>2</sub> in den Nierenzonen nach Cyclosporin A Behandlung

Stellvertretend für Calcineurin-Inhibitoren zeigte sich unter Cyclosporin A-Medikation in allen 3 Nierenzonen eine Reduktion der PGE<sub>2</sub> Konzentration.

### 5.2.7 Beeinflussung der Renin mRNA Genexpression, der Plasmarenin-Aktivität und der Plasmaaldosteron-Konzentration durch Immunsuppressiva

Eine mögliche Hauptfunktion der COX-2 in der Macula densa soll die Kontrolle der Renin-Sekretion und -Synthese in den benachbarten juxtaglomerulären Zellen anhand der PGE<sub>2</sub>-Synthese - und möglicherweise auch der PGI<sub>2</sub>-Synthese - sein. Es wurden daher die Veränderungen der Renin-Synthese und der Renin-Sekretion - reflektiert durch mRNA und Plasmarenin-Aktivität - untersucht, die aufgrund der durch Cyclosporin A und Tacrolimus induzierten Modulation der COX-2 Expression der Macula densa verursacht wurden.



**Abb. 40** Beeinflussung der Renin mRNA Genexpression, der Plasmarenin-Aktivität (PRA) und der Plasmaaldosteron-Konzentration (PAC) durch Immunsuppressiva (n = 6,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ; \* $p < 0,05$  vs Kontrolle).

#### Renin Genexpression

Auch anhand der Renin mRNA Spiegel konnten deutliche Unterschiede zwischen den beiden Calcineurin-Inhibitoren und dem mTOR-Hemmer SDZ-RAD aufgezeigt werden. Während CsA und FK506 zu einer moderaten aber dennoch signifikanten Zunahme der Renin mRNA führten, kam es bei SDZ-RAD zu einer bemerkenswerten Verringerung der Renin mRNA.

#### Plasmarenin-Aktivität

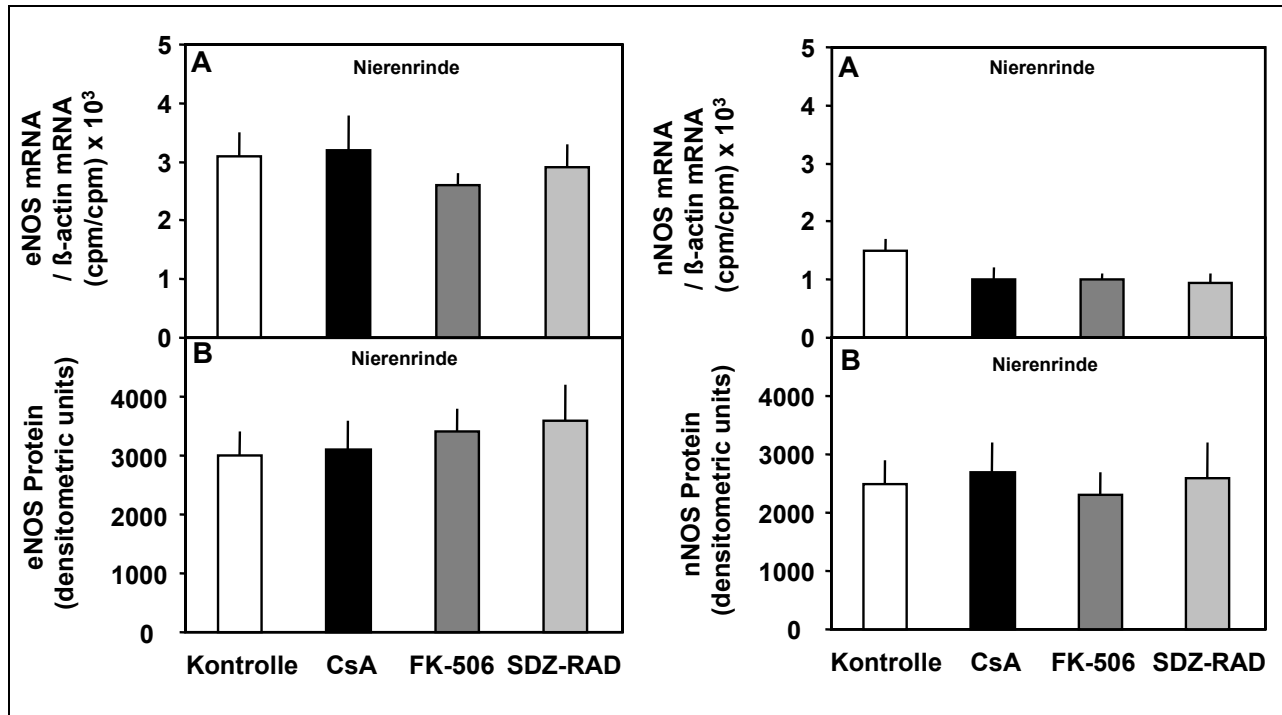
Im Gegensatz zu der unterschiedlichen Beeinflussung der Renin mRNA Spiegel kam es in jeder Verumgruppe zu einer Zunahme der Plasmarenin-Aktivität.

#### Plasmaaldosteron

Entsprechend der erhöhten Plasmarenin-Aktivität waren auch die Plasmaaldosteron-Spiegel bei den Calcineurin-Hemmern und bei SDZ-RAD signifikant erhöht.

### 5.2.8 Einfluss der Immunsuppressiva auf die Gen- und Proteinexpression der endothelialen und neuronalen NO-Synthase-Isoenzyme der Nierenrinde

Die zehntägige Behandlung der WKY-Ratten mit den drei Immunsuppressiva hatte keinen Einfluss auf die Gen- und Proteinexpression der endothelialen NO-Synthase der Nieren. Auch die renale nNOS Gen- und Proteinexpression wurde durch die Behandlung nicht beeinflusst.



**Abb. 41** Gen- und Proteinexpression von eNOS und nNOS in der Nierenrinde bei Immunsuppression (n = 6,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ).

## 5.2.9 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse

**Tab. 13** Übersicht der Ergebnisse zur Immunsuppressiva-induzierten Hypertonie.

Bedeutung der Symbole:

— : nicht untersucht

⇔ : unverändert gegenüber der Kontrolle

↑/ ↑↑/ ↑↑↑ : stark / stärker / am stärksten signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle

↓/ ↓↓/ ↓↓↓ : stark / stärker / am stärksten signifikant erniedrigt gegenüber der Kontrolle

	Calcineurin-Inhibitoren		mTOR-Hemmer
	Cyclosporin A	Tacrolimus	SDZ-RAD
<b>Allgemeine Meßwerte</b>			
Körpergewicht	↓↓	↓↓↓	↓
Wasserverbrauch	⇔	⇔	↓
Futtermittelverbrauch	⇔	↓	⇔
<b>Kardiovaskuläre Parameter</b>			
Systolischer BP	↑	↑	↑↑
Herzfrequenz	↑	↑	↓
Rel. Herzgewicht	⇔	⇔	⇔
β-/α-Myosin-Ratio	↑	↑↑↑	↑
<b>Renale Parameter und Hämatokrit</b>			
Rel. Nierengewicht	⇔	↓	⇔
Plasmakreatinin	⇔	⇔	↑
Hämatokrit	⇔	⇔	↑
<b>Katecholamine im Nierencortex</b>			
Adrenalin	⇔	⇔	⇔
Dopamin	⇔	⇔	⇔
Noradrenalin	↑	↑	⇔

	Cyclosporin A	Tacrolimus	SDZ-RAD
<b>Cyclooxygenase Genexpression im Nierencortex</b>			
COX-1 mRNA	⇔	⇔	⇔
COX-2 mRNA	↓	↓	⇔
<b>Cyclooxygenase Proteinexpression im Nierencortex</b>			
COX-1 Protein	⇔	⇔	⇔
COX-2 Protein	↓	↓	⇔
<b>Cyclooxygenase Proteinexpression in Cortex, OM und IM: Cyclosporin A Medikation</b>			
COX-1 Protein	⇔	—	—
COX-2 Protein	↓	—	—
<b>Prostaglandin E<sub>2</sub> im Nierencortex</b>			
PGE <sub>2</sub> im Cortex	↓	↓	⇔
<b>Prostaglandin E<sub>2</sub> in Cortex, OM und IM bei Cyclosporin A Behandlung</b>			
PGE <sub>2</sub>	↓	—	—
<b>Renin mRNA des Nierencortex, Plasmareninaktivität und Plasmaaldosteronaktivität</b>			
Renin mRNA	↑	↑	↓
Plasmarenin	↑	↑	↑
Plasmaaldosteron	↑	↑	↑
<b>Gen- und Proteinexpression der endothelialen und neuronalen NO-Synthase im Cortex</b>			
eNOS/nNOS mRNA	⇔	⇔	⇔
eNOS/nNOS Protein	⇔	⇔	⇔



---

## 5.2.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

### 1. *Körpergewicht und Futterverbrauch*

---

- Es kam bei allen 3 Immunsuppressiva zu einer signifikanten Verringerung des Körpergewichts.
- Dabei war die körperliche Verfassung der SDZ-RAD Tiere während des zehntägigen Behandlungszeitraumes am besten.
- Nur bei Tacrolimus zeigte sich ein deutlich verringerter Futterverbrauch, welcher sich in der geringsten Gewichtszunahme widerspiegelte.

### 2. *Kardiovaskuläre Parameter*

---

- Die Calcineurin-Inhibitoren führten nach 8 Tagen zu einer signifikanten Erhöhung des systolischen Blutdrucks. Die Herzfrequenz war bei allen Messungen erhöht.
- Der mTOR-Hemmer bewirkte die stärkste, bereits am 4. Tag einsetzende Blutdruck-Erhöhung. Die Herzfrequenz entsprach bis zu Tag 9 der Frequenz der Kontrolltiere. Am 10. Tag zeigte sich jedoch unter SDZ-RAD eine deutlich erniedrigte Herzfrequenz.
- Bei gegenüber Placebo unverändertem relativen Herzgewicht war die  $\beta$ -/ $\alpha$ -Myosin-Ratio in jeder Verumgruppe signifikant erhöht.
- Tacrolimus-Tiere zeigten neben der am stärksten erhöhten Herzfrequenz auch die größte Myosin-Ratio.

### 3. *Renale Parameter und Wasserverbrauch*

---

- In der Tacrolimus-Gruppe war das relative Nierengewicht geringfügig erniedrigt.
- Unter SDZ-RAD kam es zu einer deutlichen Abnahme des Wasserverbrauchs und zu signifikant erhöhten Hämatokrit- und Plasmakreatinin-Werten.

### 4. *Katecholamine im Nierencortex*

---

- Bei Behandlung mit Calcineurin-Inhibitoren deuten signifikant erhöhte Noradrenalin-Spiegel auf eine gesteigerte Aktivität des sympathischen Nervensystems des Nierencortex hin. Die Adrenalin- und Dopamin-Spiegel waren nicht verändert.
- Der mTOR-Hemmer hatte keinen Einfluss auf die renokortikalen Katecholamin-Spiegel.

### 5. *Gen- und Proteinexpression der Cyclooxygenase-Isoenzyme*

---

- Die COX-1 Gen- und Proteinexpression wurde durch kein Immunsuppressivum beeinflusst.
- Die Behandlung mit Calcineurin-Inhibitoren führte zu einer bemerkenswerten Reduktion der basalen COX-2 mRNA- und Proteinspiegel der Niere.
- SDZ-RAD hatte keinen Einfluss auf die renale Gen- und Proteinexpression der COX-2.

### 6. *Prostaglandin E<sub>2</sub> in den Nieren*

---

- In Übereinstimmung mit der unter Calcineurin-Hemmung zu beobachtenden Reduktion der basalen COX-2 Expression kam es nur bei Calcineurin-Hemmung zu einer signifikanten Abnahme der renokortikalen Prostaglandin E<sub>2</sub> Spiegel.

### ***7. Renin Genexpression , Plasmarenin und Plasmaaldosteron***

---

- Cyclosporin A und Tacrolimus führten zu einer Erhöhung der Renin mRNA Spiegel, während SDZ-RAD eine Erniedrigung bewirkte.
- Plasmarenin-Aktivität und Plasmaaldosteron-Konzentration waren jedoch bei allen drei Verumgruppen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe gesteigert.

### ***8. Gen- und Proteinexpression der endothelialen und neuronalen NO-Synthase im Cortex***

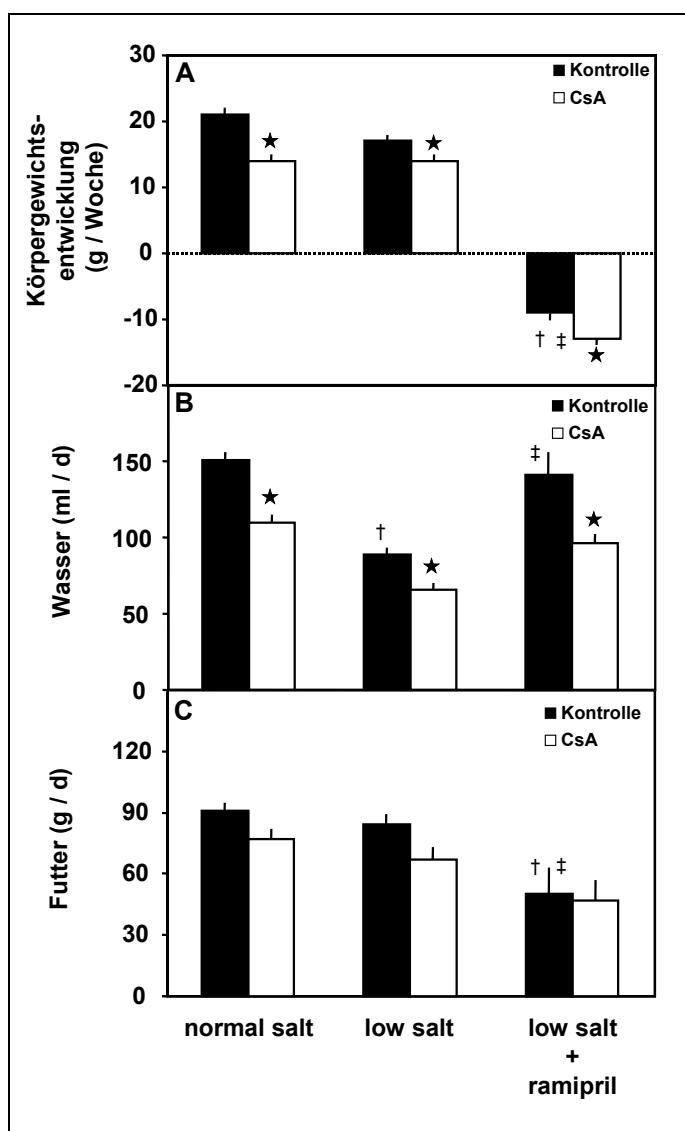
---

- Die eNOS- und nNOS Gen- und Proteinexpression des Nierencortex wurde weder durch die Calcineurin-Hemmer noch durch SDZ-RAD beeinflusst.

### 5.3. Einfluss von Cyclosporin A auf die Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems und der renalen COX-2- und nNOS-Isoenzyme

#### 5.3.1 Versuchsmodell

Es ist allgemein bekannt, dass die basale Expression der Cyclooxygenase 2 in der Macula densa und die Reninexpression unter verschiedenen Bedingungen wie Salz-mangel, ACE-Hemmung oder renaler Hypoperfusion parallel reguliert werden. Daher wurde an WKY-Ratten die Wirkung von Cyclosporin A auf die typische Stimulation dieser Enzyme - verursacht durch salzarme Diät oder die Kombination von salzarmen Diät mit dem ACE-Hemmstoff Ramipril - untersucht. Es wurden dazu 7 Tage lang jeweils 6 Kontrolltiere und 6 Cyclosporin A-Tiere (15mg/kg/Tag) mit Normalsalz (NS/NS+CsA), Niedrigsalz (LS/LS+CsA) oder einer Kombination aus Niedrigsalz und Ramipril (LS-RA/LS-RA+CsA) behandelt.



#### 5.3.2 Entwicklung von Körpergewicht, Futter- und Wasserverbrauch

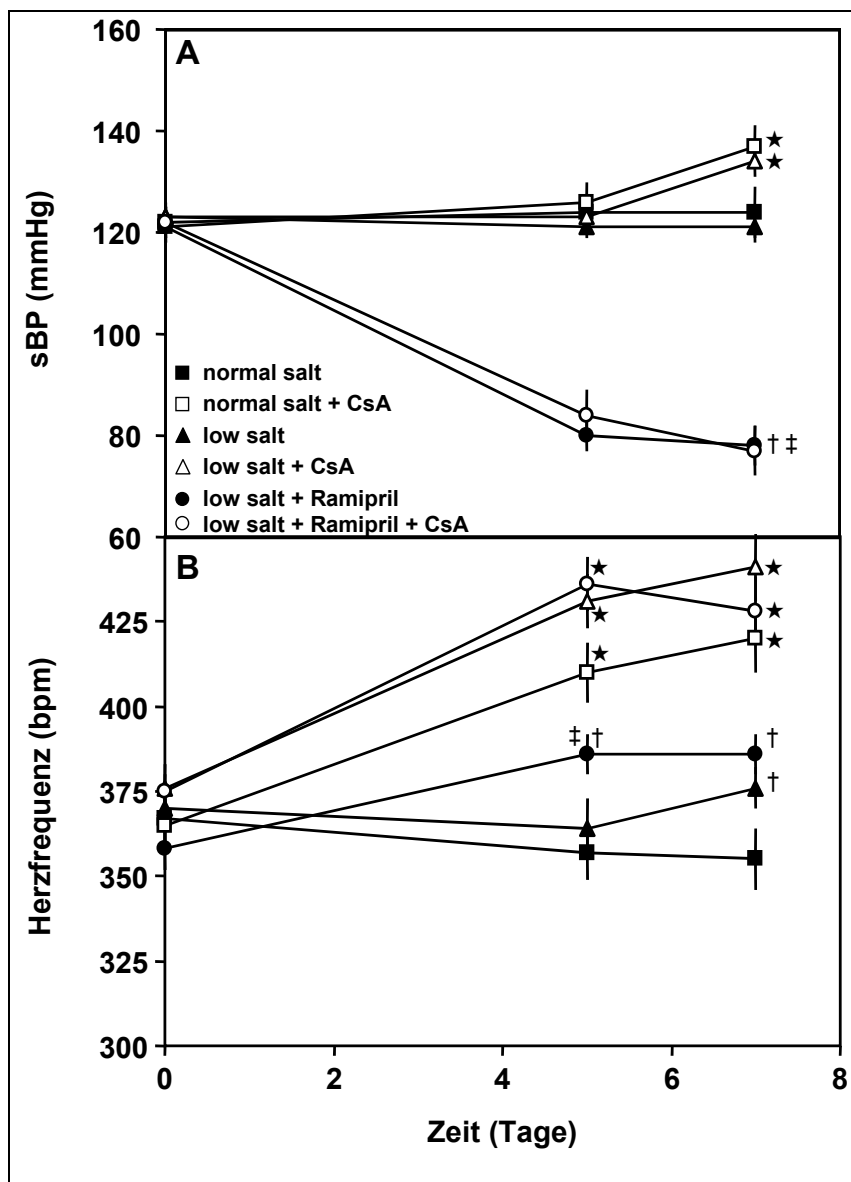
Bei den LS-Tieren war der Wasserbedarf signifikant niedriger als bei der NS-Gruppe. Die Kombination LS+RA führte zu einem der NS-Gruppe entsprechenden Wasserverbrauch, der im Vergleich zur LS Gruppe erhöht war.

In der LS-RA-Gruppe waren Gewicht und Futterbedarf sowohl gegenüber NS als auch gegenüber LS erniedrigt.

Cyclosporin A führte in jeder der 3 Gruppen zu einer deutlichen Verringerung des Körpergewichts und des Wasserbedarfs gegenüber der zugehörigen Kontrolle.

**Abb. 42** Abb.: Entwicklung von Körpergewicht, Futter- und Wasserverbrauch bei Stimulation von RAS und COX-2 (n = 6,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ; ★p<0,05 vs Kontrolle; † p<0,05 vs NS; ‡ p<0,05 vs LS).

### 5.3.3 Systolischer Blutdruck und Herzfrequenz



**Abb. 43** Beeinflussung von Blutdruck und Herzfrequenz bei Stimulation von RAS und COX-2 (n = 6, x ± SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle; † p<0,05 vs NS; ‡ p<0,05 vs LS).

Die Kombination von Normal- und Natriumsalz-Nahrung mit Cyclosporin A führte am 7. Tag (Tab. 14) zu einer signifikanten Erhöhung des Blutdrucks gegenüber der unverändert normotensiven NS- bzw. LS-Kontrolle.

Im Gegensatz hierzu führte salzarme Diät in Kombination mit dem ACE-Hemmer Ramipril zu einer deutlichen Blutdrucksenkung.

Cyclosporin A hatte keinen Einfluss auf die Blutdrucksenkung.

Bezüglich der Herzfrequenz, zeigte sich in jeder Gruppe unter CsA-Behandlung eine Erhöhung in der Reihenfolge:

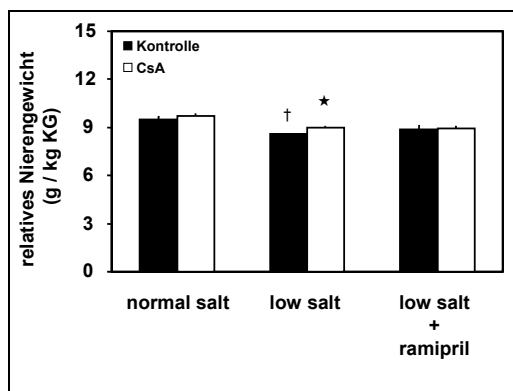
LS+CsA > LS-RA+CsA > NS+CsA.

Auch bei LS und LS-RA war die Herzfrequenz im Vergleich zu NS gesteigert: LS-RA > LS.

	NS	NS+CsA	LS	LS+CsA	LS+RA	LS+RA+CsA
Blutdruck ± SEM (mmHg)	123,8 ± 4,8	136,7 ± 4,4	121 ± 2,9	134,2 ± 2,4	78,3 ± 3,6	77,5 ± 4,4
Herzfrequenz ± SEM (bpm)	355 ± 12,9	422,7 ± 11,7	376 ± 6,0	441,7 ± 10,5	391,3 ± 6,0	428,3 ± 10,5

**Tab. 14** Blutdruck und Herzfrequenz am 7. Tag der Stimulation (n = 6, x ± SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle; † p<0,05 vs NS; ‡ p<0,05 vs LS).

### 5.3.4 Renale Parameter



#### 5.3.4.1 Relatives Nierengewicht

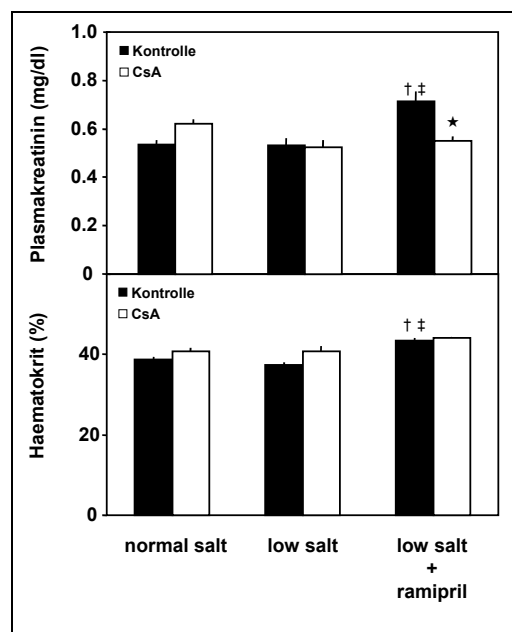
In der LS-Gruppe kam es, wie aus Abb. 44 ersichtlich, (neben einem verringerten Wasserverbrauch) auch zu einem reduzierten relativen Nierengewicht. Daraus resultiert das im Vergleich zu LS signifikant höhere Nierengewicht unter LS+CsA.

**Abb. 44** Beeinflussung des relativen Nierengewichts bei Stimulation von RAS und COX-2 ( $n = 6$ ,  $x \pm \text{SEM}$ ; ★ $p < 0,05$  vs Kontrolle; † $p < 0,05$  vs NS).

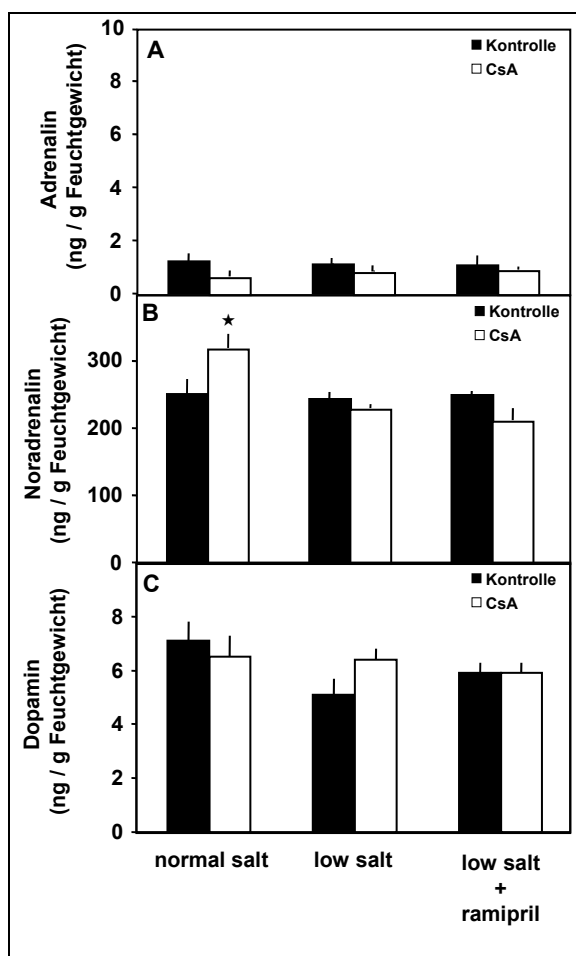
#### 5.3.4.2 Plasmakreatinin und Hämatokrit

Sowohl das Plasmakreatinin als auch der Hämatokrit waren in der LS-RA-Gruppe signifikant höher als in der NS- und LS-Gruppe.

Die Kombination LS-RA+CsA zeigte hingegen ein der NS-Kontrolle entsprechendes Plasmakreatinin. Innerhalb der anderen Gruppen kam es zu keiner Veränderung dieser beiden Parameter.



**Abb. 45** Beeinflussung von Plasmakreatinin und Hämatokrit bei Stimulation von RAS und COX-2 ( $n = 6$ ,  $x \pm \text{SEM}$ ; ★ $p < 0,05$  vs Kontrolle; † $p < 0,05$  vs NS; ‡ $p < 0,05$  vs LS).



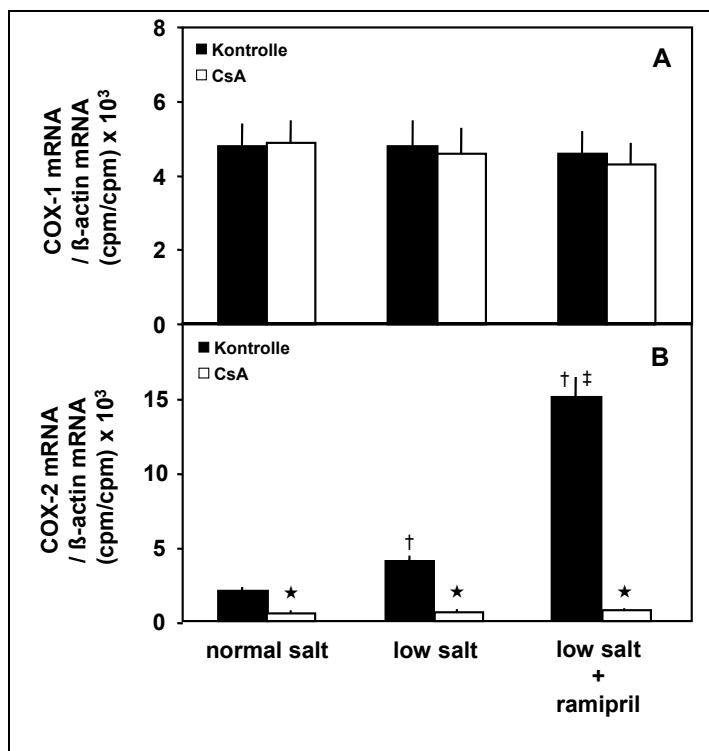
#### 5.3.4.3 Katecholamine in der Nierenrinde

Die nachgewiesenen Adrenalin- und Dopamin-Spiegel unterschieden sich in keiner der Gruppen.

Allein unter Normalsalz kam es bei Kombination mit Cyclosporin A zu signifikant höheren Noradrenalin-Spiegeln im Nierencortex.

**Abb. 46** Katecholamine in der Nierenrinde bei Stimulation von RAS und COX-2 ( $n=6$ ,  $x \pm \text{SEM}$ ; ★ $p < 0,05$  vs Kontrolle).

### 5.3.5 COX-1 und COX-2 im Nierencortex



**Abb. 47** Genexpression von COX-1 und COX-2 in der Nierenrinde bei Stimulation der COX-2 (n = 6,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ; ★p<0,05 vs Kontrolle; †p<0,05 vs NS; ‡p<0,05 vs LS).

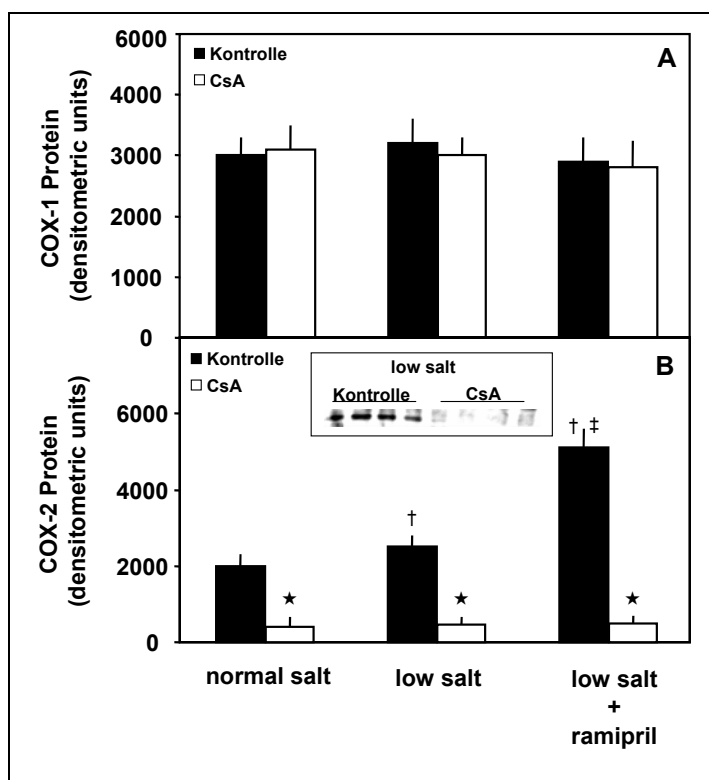
#### 5.3.5.1 Genexpression der COX-1 und COX-2

Während die renokortikale COX-1 Genexpression bei LS und LS-RA nicht verändert wurde, kam es mit LS zu einer 2-fachen und mit LS-RA zu einer 7-fachen Erhöhung der COX-2-mRNA Spiegel.

Die Kombination mit Cyclosporin A hatte in keiner Gruppe einen Einfluss auf die entsprechenden COX-1-Spiegel.

Hingegen zeigte sich unter Normalsalz die für CsA typische Verringerung der basalen COX-2 mRNA Spiegel.

Die LS- bzw. LS-RA-induzierte Stimulation der COX-2 Expression wurde durch Cyclosporin-Gabe ebenfalls verhindert.



**Abb. 48** Proteinexpression von COX-1 und COX-2 in der Nierenrinde bei Stimulation der COX-2 (n = 6,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ; ★p<0,05 vs Kontrolle; †p<0,05 vs NS; ‡p<0,05 vs LS).

#### 5.3.5.2 Proteinexpression der COX-1 und COX-2

Die Ergebnisse der Genexpression werden durch eine damit übereinstimmende Proteinexpression der beiden Cyclooxygenase-Isoenzyme bestätigt.

Während die COX-1 Immunoreaktivität im Nierencortex durch keine Behandlungsmaßnahme beeinflusst wurde, war die entsprechende COX-2 Immunoreaktivität unter Cyclosporin A-Behandlung deutlich verringert.

### 5.3.5.3 Immunhistochemische Färbung der Cyclooxygenase 2 im Nierencortex

Die Cyclosporin A-induzierte Verringerung der renokortikalen COX-2 Expression in den TALH / Macula densa Strukturen konnte auch immunhistochemisch nachgewiesen werden.

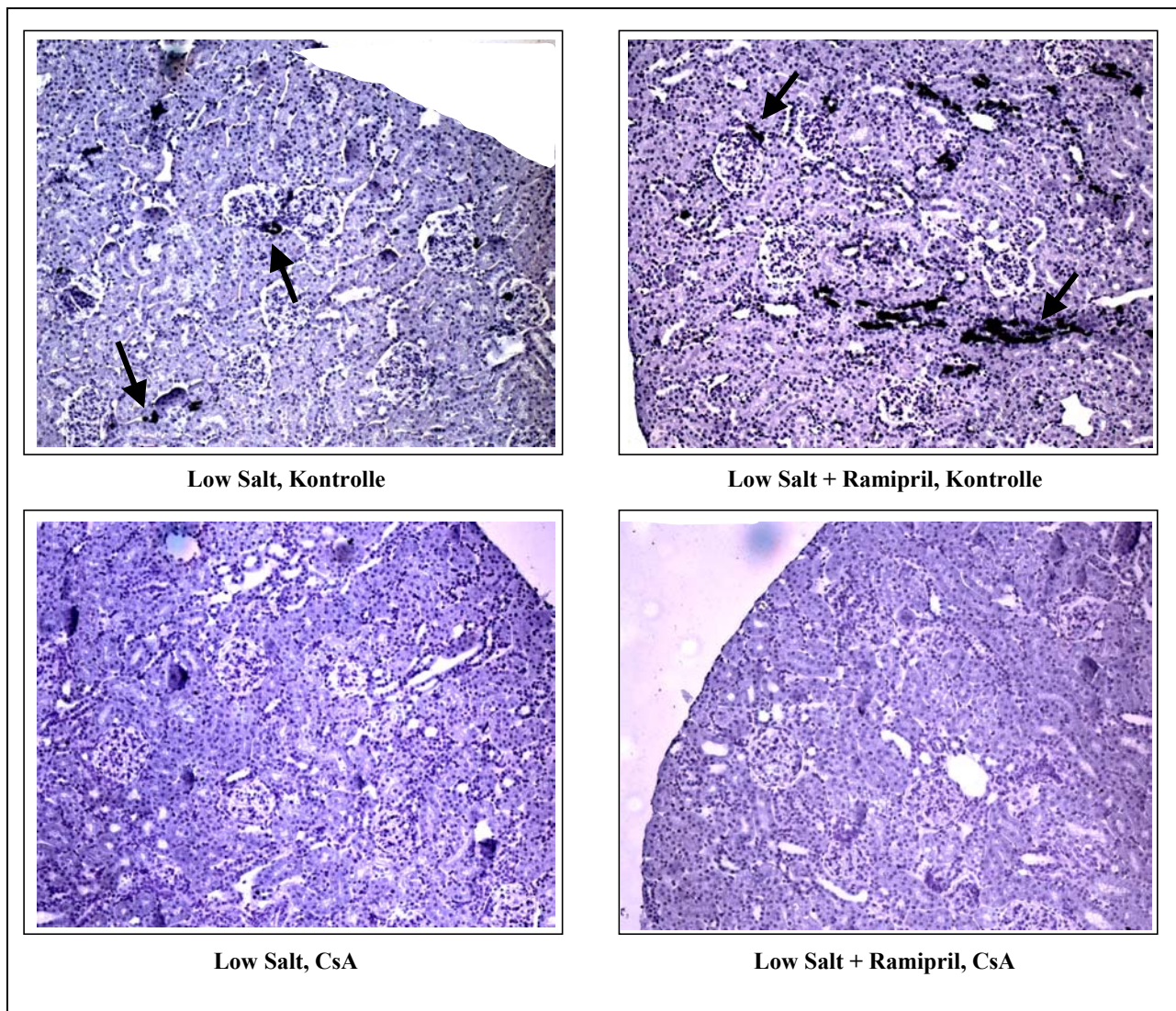


Abb. 49 Immunhistochemische Färbung der COX-2 in der Nierenrinde.

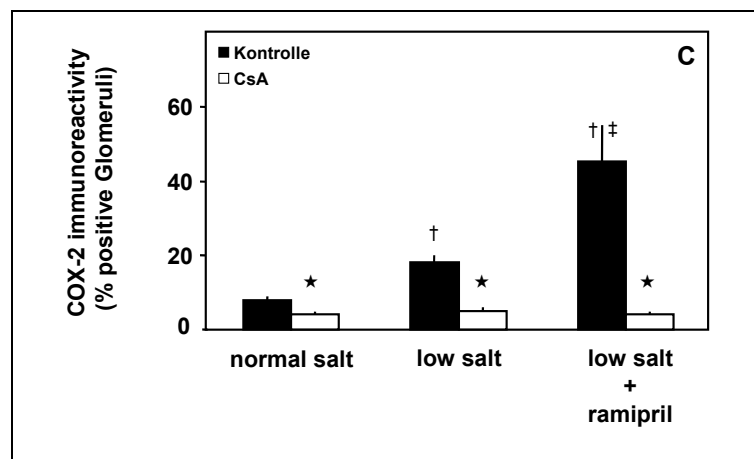
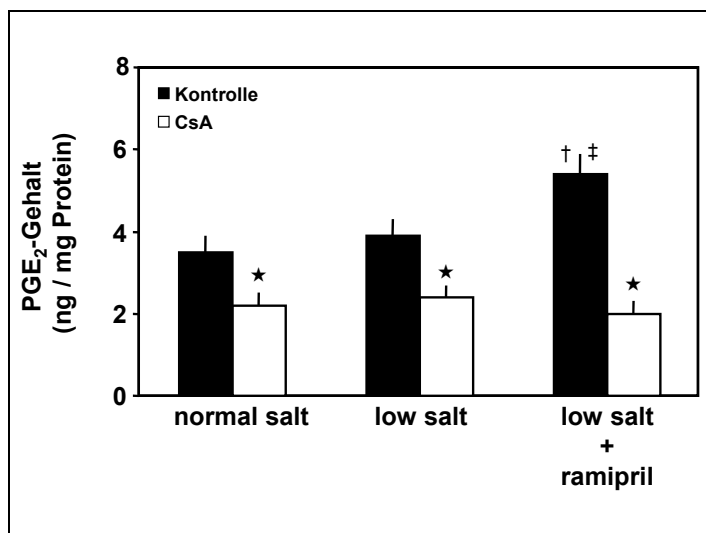


Abb. 50 COX-2 Immunoreaktivität in der Nierenrinde bei Stimulation der COX-2 (n = 6, x ± SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle; † p<0,05 vs NS; ‡ p<0,05 vs LS).

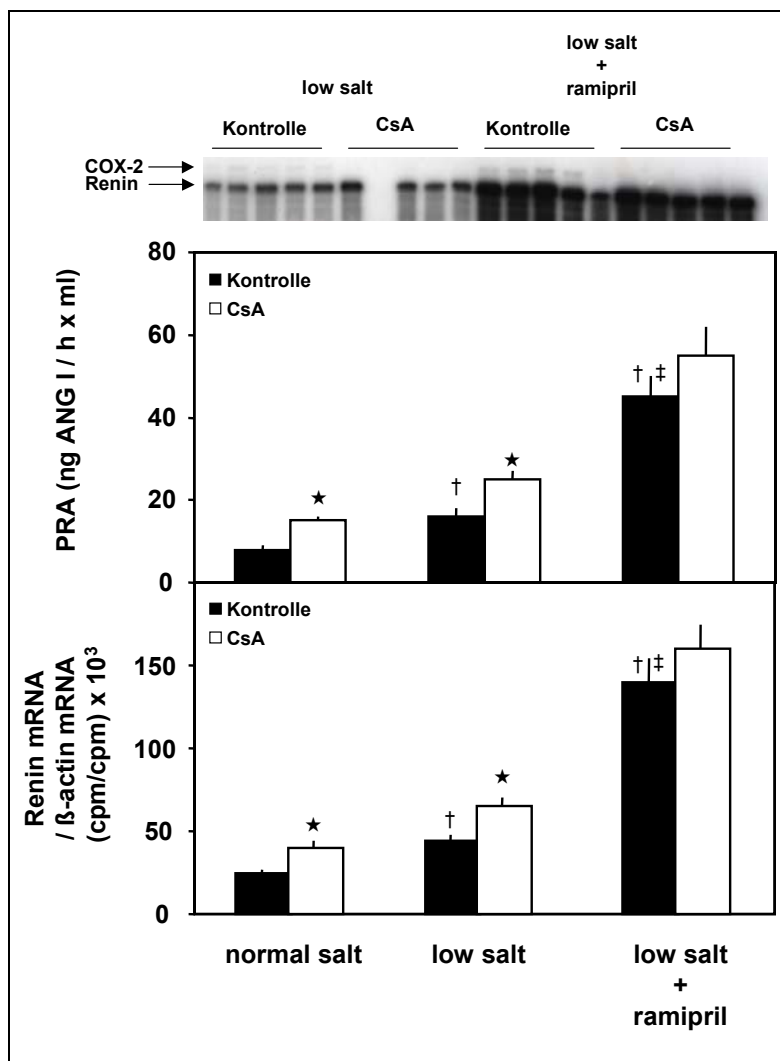


**Abb. 51** PGE<sub>2</sub> Gehalt der Nierenrinde bei Stimulation der COX-2 (n = 6, x ± SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle; † p<0,05 vs NS; ‡ p<0,05 vs LS).

### 5.3.6 PGE<sub>2</sub> im Nierencortex

Die Behandlung mit LS-RA führte zu signifikant gegenüber NS und LS erhöhten PGE<sub>2</sub>-Spiegeln im Nierencortex.

Entsprechend der COX-2 Expression war PGE<sub>2</sub> unter Cyclosporin A in allen 3 Gruppen signifikant erniedrigt.



**Abb. 52** Renin Genexpression und Plasmaaldosteron bei Stimulation von RAS und COX-2 (n = 6, x ± SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle; † p<0,05 vs NS; ‡ p<0,05 vs LS).

### 5.3.7 Renin

#### 5.3.7.1 Renin Genexpression im Nierencortex und Plasmarenin-Aktivität

Die Untersuchung der Renin Genexpression und der Reninaktivität im Plasma lieferte weitere Erkenntnisse im Hinblick auf eine mögliche Interferenz zwischen der Regulation der Cyclooxygenase 2 in der Macula densa und der Sekretion und Synthese von Renin im juxtaglomerulären Apparat.

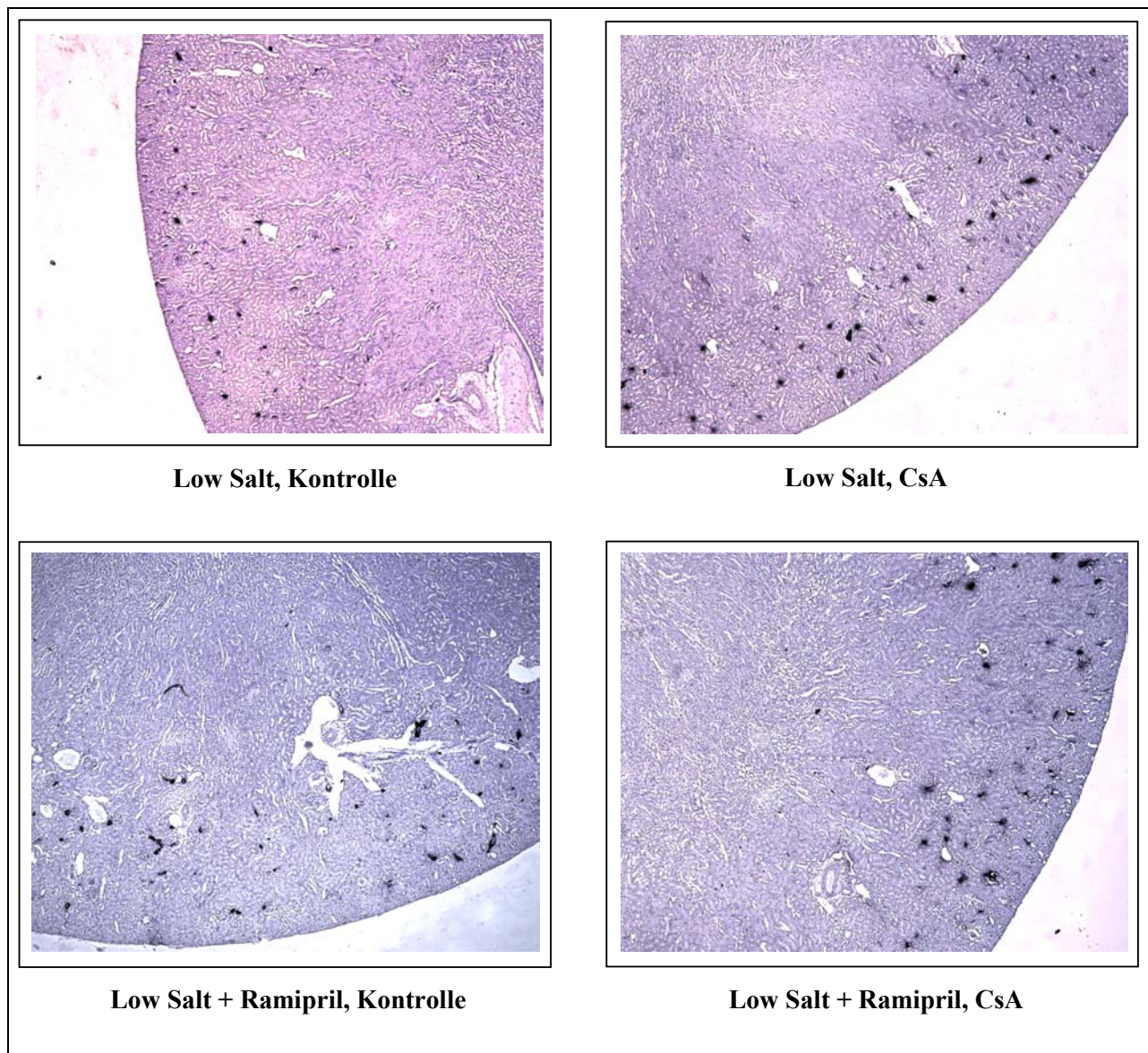
So zeigt sich unter LS und LS-RA eine signifikante Zunahme der renokortikalen Renin mRNA und der Plasmarenin-Aktivität.

Diese Steigerung wurde durch gleichzeitige Behandlung mit Cyclosporin A eher verstärkt als abgeschwächt. Die resultierende Erhöhung war bei CsA-Gabe unter NS bzw. LS signifikant.



### 5.3.7.2 Immunhistochemische Färbung des Renins im Nierencortex

Die Daten der Renin mRNA wurden durch entsprechende, gleichartige Veränderungen der Renin Immunoreaktivität in den TALH/Macula densa Strukturen bestätigt.

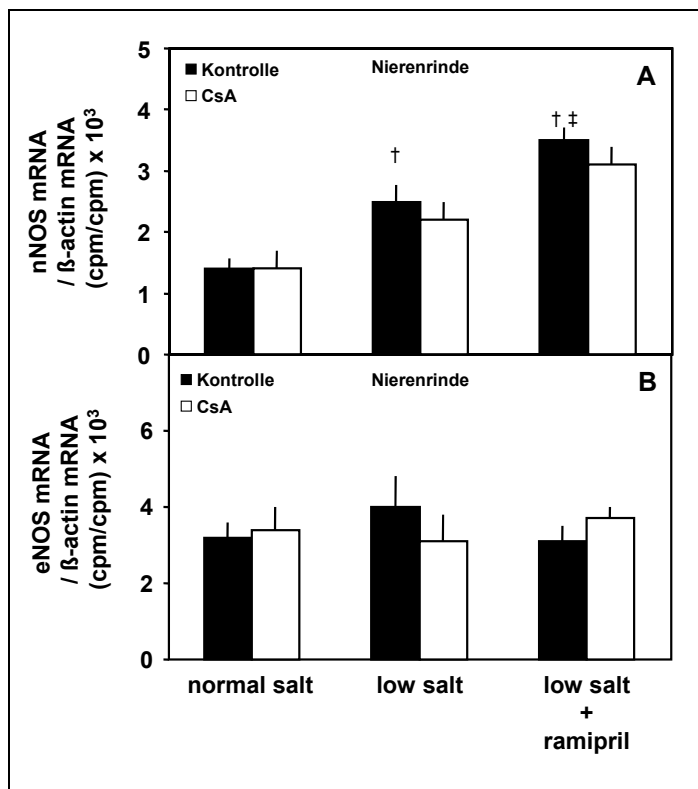


**Abb. 53** Immunhistochemische Färbung von Renin in der Nierenrinde bei Stimulation von RAS und COX-2.

### 5.3.8 Endotheliale und neuronale NO-Synthase im Nierencortex

Zu den vielen, die Reninsynthese und -Sekretion stimulierenden Faktoren zählt auch Stickstoffmonoxid (NO). Anhand von Versuchen mit e- und nNOS Knock-out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass für die Stimulation der Renin-Sekretion vor allem das vom Endothel produzierte NO relevant ist.

#### 5.3.8.1 Genexpression von eNOS und nNOS



**Abb. 54** Genexpression von eNOS und nNOS bei Stimulation von RAS, COX-2 und nNOS (n = 6, x ± SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle; † p<0,05 vs NS; ‡ p<0,05 vs LS).

Die mRNA Spiegel der im Nierencortex konstitutiv exprimierten, endothelialen NO-Synthase wurden durch LS und LS-RA nicht verändert.

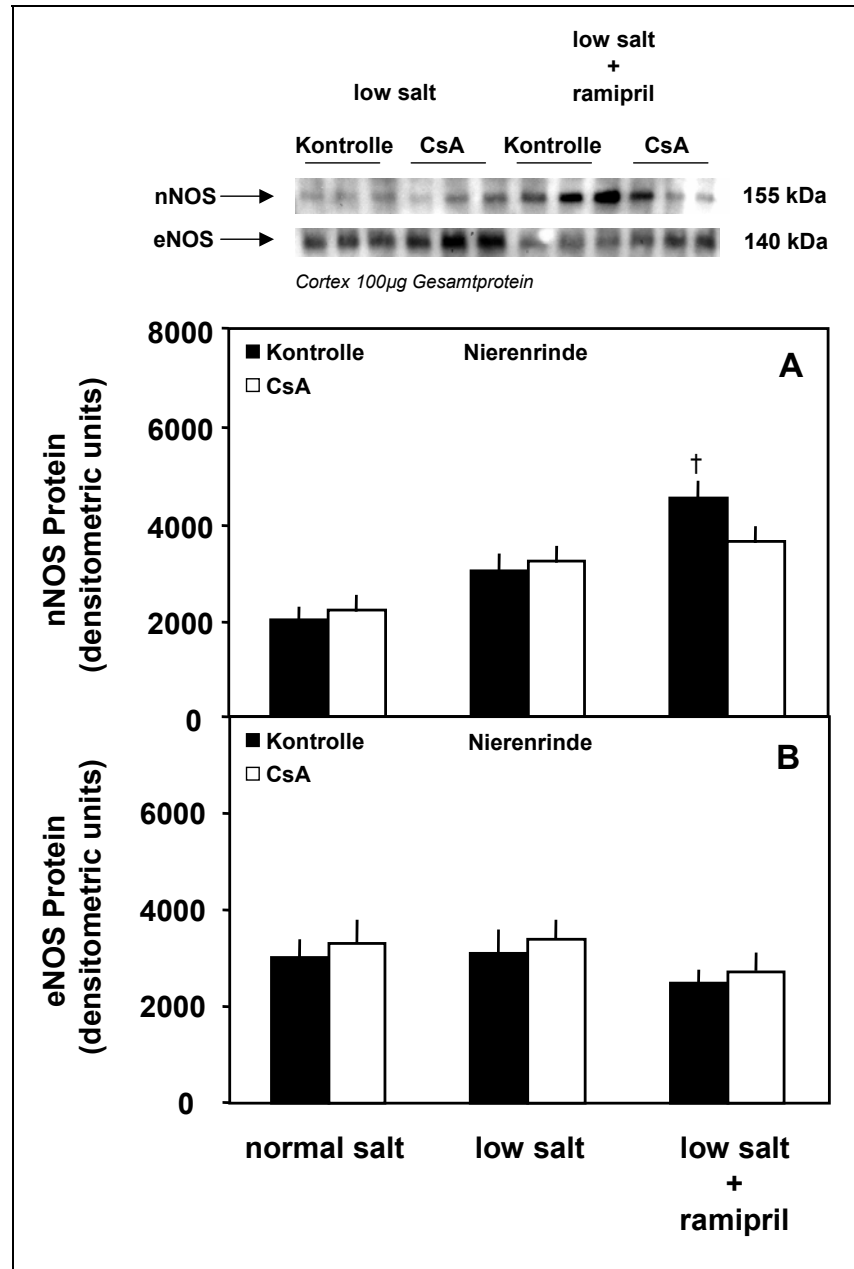
Im Gegensatz zur eNOS wird die Expression der neuronalen NO-Synthase in den Macula densa Zellen und in vereinzelten anderen Zellen des dicken aufsteigenden Astes der Henleschen Schleife z.B. unter Salz-mangel, ACE-Blockade oder renaler Hypoperfusion parallel zur Renin- und COX-2-Expression reguliert.

Dies wurde deutlich bestätigt anhand der signifikant gegenüber NS bzw. LS erhöhten nNOS mRNA Spiegel bei LS- bzw. LS-RA-Behandlung.

Cyclosporin A konnte die Genexpression der endothelialen und neuronalen NO-Synthase in keiner der 3 Gruppen beeinflussen.

### 5.3.8.2 Proteinexpression von eNOS und nNOS

Die Proteinexpression der eNOS war ebenso wie ihre Genexpression unter allen Behandlungsmaßnahmen unverändert. Auch das Protein der nNOS war lediglich in der LS-RA-Gruppe signifikant gegenüber NS erhöht.



**Abb. 55** Proteinexpression von eNOS und nNOS bei Stimulation von RAS, COX-2 und nNOS ( $n = 6$ ,  $x \pm \text{SEM}$ ; ★ $p < 0,05$  vs Kontrolle; †  $p < 0,05$  vs NS).

### 5.3.9 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse

**Tab. 15** Übersicht der Ergebnisse zum Einfluss von Cyclosporin A auf die Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems und der renalen COX-2- und nNOS-Isoenzyme.

Bedeutung der Symbole:

— : nicht untersucht

⇔ : unverändert gegenüber der Kontrolle

↑ / ↓ : signifikant erhöht / erniedrigt gegenüber der Kontrolle

	NS+CsA vs NS	LS+CsA vs LS	LS- RA+CsA vs LS-RA	LS vs NS	LS-RA vs NS	LS-RA vs LS
<b>Allgemeine Daten</b>						
Körpergewicht	↓	↓	↓	⇔	↓	↓
Futtermittelverbrauch	⇔	⇔	⇔	⇔	↓	↓
Wasserverbrauch	↓	↓	↓	↓	⇔	↑
<b>Kardiovaskuläre Parameter am 7.Tag</b>						
Systolischer BP	↑	↑	⇔	⇔	↓	↓
Herzfrequenz	↑	↑	↑	↑	↑	⇔
<b>Renale Parameter und Hämatokrit</b>						
Nierengewicht <sub>rel</sub>	⇔	↑	⇔	↓	⇔	⇔
Plasmakreatinin	⇔	⇔	↓	⇔	↑	↑
Hämatokrit	⇔	⇔	⇔	⇔	↑	↑
<b>Katecholamine im Nierencortex</b>						
Adrenalin	⇔	⇔	⇔	⇔	⇔	⇔
Dopamin	⇔	⇔	⇔	⇔	⇔	⇔
Noradrenalin	↑	⇔	⇔	⇔	⇔	⇔

	NS+CsA vs NS	LS+CsA vs LS	LS- RA+CsA vs LS-RA	LS vs NS	LS-RA vs NS	LS-RA vs LS
<b>Cyclooxygenase Genexpression im Nierencortex</b>						
COX-1 mRNA	⇔	⇔	⇔	⇔	⇔	⇔
COX-2 mRNA	↓	↓	↓	↑	↑	↑
<b>Cyclooxygenase Proteinexpression im Nierencortex</b>						
COX-1 Protein	⇔	⇔	⇔	⇔	⇔	⇔
COX-2 Protein	↓	↓	↓	↑	↑	↑
<b>Prostaglandin E<sub>2</sub> im Nierencortex</b>						
PGE <sub>2</sub>	↓	↓	↓	⇔	↑	↑
<b>Renin mRNA des Nierencortex und Plasmapreninaktivität</b>						
Renin mRNA	↑	↑	⇔	↑	↑	↑
Plasmaprenin	↑	↑	⇔	↑	↑	↑
<b>Genexpression der endothelialen und neuronalen NO-Synthase im Nierencortex</b>						
eNOS mRNA	⇔	⇔	⇔	⇔	⇔	⇔
nNOS mRNA	⇔	⇔	⇔	↑	↑	↑
<b>Proteinexpression der endothelialen und neuronalen NO-Synthase im Nierencortex</b>						
eNOS Protein	⇔	⇔	⇔	⇔	⇔	⇔
nNOS Protein	⇔	⇔	⇔	⇔	↑	⇔

---

### 5.3.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

#### 1. *Körpergewicht, Futterverbrauch*

---

- Bei den LS-RA-Tieren zeigte sich ein gegenüber NS und LS erniedrigtes Körpergewicht ebenso wie eine Abnahme des Futterverbrauchs.
- Die Kombination mit Cyclosporin A führte in jeder Gruppe zu einer signifikanten Verringerung des Körpergewichts.

#### 2. *Kardiovaskuläre Parameter*

---

- Unter LS-RA sank der Blutdruck signifikant gegenüber NS und LS ab.
- Bei gleichzeitiger Gabe von LS-RA und CsA veränderte sich der Blutdruck nicht.
- Bei der Kombinationen NS+CsA und LS+CsA kam es zu einer signifikanten Blutdruck-Erhöhung gegenüber den normotensiven NS- und LS-Kontrollen.
- Bezüglich der Herzfrequenz zeigten LS- und LS-RA-Tiere eine signifikante Steigerung verglichen mit NS (LS-RA > LS).
- Die simultane Gabe von CsA führte zu einer noch stärkeren Zunahme der Herzfrequenz in der Reihenfolge LS+CsA > LS-RA+CsA > NS+CsA

#### 3. *Renale Parameter, Hämatokrit und Wasserverbrauch*

---

- In der LS-Gruppe kam es gegenüber NS zu einer signifikanten Verringerung des Wasserverbrauchs und des relativen Nierengewichts.
- Die Gabe von CsA bewirkte ebenfalls in allen 3 Gruppen eine Reduktion des Wasserverbrauchs.
- Unter LS-RA wurden signifikant erhöhte Plasmakreatinin- und Hämatokritwerte beobachtet.
- Bei LS-RA+CsA zeigten sich hingegen normale Plasmakreatininwerte.

#### 4. *Katecholamine im Nierencortex*

---

- Eine gesteigerte Aktivität des renalen Sympathikus-Tonus konnte nur in der NS+CsA-Gruppe festgestellt werden: verglichen mit NS zeigten sich hier deutlich höhere Noradrenalin-Spiegel.

#### 5. *Gen- und Proteinexpression der Cyclooxygenase-Isoenzyme im Nierencortex*

---

- Die Gen- und Proteinexpression der COX-1 wurde durch keine Behandlungsmaßnahme beeinflusst.
- Unter LS wurde die Genexpression im Nierencortex 2-fach erhöht gegenüber NS.
- Unter LS-RA kam es zu 7-fach höheren COX-2 mRNA Spiegeln verglichen mit NS.
- Die Proteinexpression der basalen COX-2 wurde unter LS bzw. LS-RA ebenfalls gesteigert.
- Die Behandlung mit Cyclosporin A führte bei NS, LS und LS-RA zu einer bemerkenswerten Reduktion der basalen COX-2 mRNA- und Proteinspiegel der Nierenrinde.

## **6. Prostaglandin $E_2$ im Nierencortex**

---

- Die Kombination von LS-RA führte verglichen mit NS und LS zu signifikant erhöhten  $PGE_2$ -Spiegeln im Nierencortex.
- CsA-Gabe erniedrigte die  $PGE_2$ -Konzentrationen in allen drei Gruppen.

## **7. Renin Genexpression und Plasmareninaktivität**

---

- Renin mRNA Spiegel und Plasmarenin-Aktivitäten waren unter LS und LS-RA erhöht.
- Bei Gabe von CsA kam es bei NS und LS zu einer zusätzlichen Verstärkung der beiden Parameter. Unter LS-RA+CsA entsprachen die Messwerte jenen der LS-RA Kontrolle.

## **8. Gen- und Proteinexpression der endothelialen und neuronalen NO-Synthase im Cortex**

---

- Die Gen- und Proteinexpression der endothelialen NO-Synthase des Nierencortex wurde durch keine Behandlungsmaßnahme beeinflusst.
- Die mRNA Spiegel der neuronalen NO-Synthase waren hingegen unter LS und LS-RA erhöht.
- Eine gesteigert nNOS Proteinexpression war jedoch nur bei LS-RA im Vergleich zu NS festzustellen.
- Die 7-tägige Behandlung mit Cyclosporin A hatte keinen Einfluss auf die Expression der beiden NO-Synthasen.

## 6 Diskussion

### 6.1 Diskussion der Ergebnisse zur genetisch bedingten Hypertonie

Im Hinblick auf die besondere Bedeutung der Niere für die Auslösung und Aufrechterhaltung der primären Hypertonie, lag der Schwerpunkt im ersten Teil der Dissertation auf der Untersuchung des Renin-Angiotensin-Systems und der renalen Gen- und Proteinexpression der Cyclooxygenase-Isoenzyme und der endothelialen und neuronalen NO-Synthase-Isoenzyme in der Frühphase der Hypertonieentwicklung. Des Weiteren wurden Unterschiede in der Organverteilung der Cyclooxygenase- und NO-Synthase-Isoenzyme untersucht.

#### 6.1.1 Die Entwicklung des Körpergewichts

Das Körpergewicht der SHR- und WKY-Ratten stieg während des Untersuchungszeitraumes kontinuierlich an. Trotz gleichartiger Zunahme von Futter- und Wasserverbrauch zeigten SHR ab der 6. Lebenswoche ein gegenüber WKY signifikant verringertes Körpergewicht. Dies stimmt überein mit entsprechenden Beobachtungen anderer Autoren bei 3 bis 16 Wochen alten SHR- und WKY-Tieren (*Chou et al., 1998; Vaziri et al., 1998; Hayakawa et al., 1998*).

#### 6.1.2 Blutdruck, Herzfrequenz und Herzhypertrophie bei SHR

Wie von mehreren Autoren beschrieben, kommt es bei spontan hypertensive Ratten beginnend mit der 4. bis 5. Lebenswoche zu einer signifikanten Erhöhung des systolischen Blutdrucks (*Okamoto et al., 1963; Grobecker et al., 1982*), welcher in etwa bis zur 20. Lebenswoche hin kontinuierlich weitersteigt und dann systolische Werte von 180-200 mmHg erreicht (*Pinto et al., 1998*).

Obwohl sich die Herzfrequenz bei beiden Stämmen zur 7. Lebenswoche hin verringerte, war sie bei SHR genau zu Beginn des Blutdruckanstiegs während der 4. und 5. Lebenswoche signifikant erhöht. Das simultane Einsetzen von beginnendem Blutdruckanstieg und signifikanter Steigerung der Herzfrequenz bei 4 Wochen alten SH-Ratten spricht für eine fundamentale Beteiligung des sympathoadrenalen Systems (SAS) an der beginnenden Hypertonie-Entwicklung (*Grobecker et al., 1977*).

Es konnte diesbezüglich bei jungen SHR bereits vor und während des Beginns der Hypertonie unter anderem eine Zunahme des Noradrenalin-Gehalts des Herzens mit nachfolgender Downregulation von  $\beta_1$ -Rezeptoren, einer gesteigerten  $G_i\alpha$ -Proteinexpression und daraus resultierender Adenylatcyclase-Desensitivierung des Herzens festgestellt werden (*Böhm et al., 1994*). Daneben zeichnen sich SHR, ganz besonders junge SHR im Alter von 4 bis 10 Wochen, durch eine Reduktion des über präsynaptische  $\alpha_2$ -Rezeptoren vermittelten, negativen Feedbackmechanismus der Noradrenalin-Freisetzung aus (*Galloway et al., 1982; Tsuda et al., 1987; Szemerédi et al., 1988*). Dies geht einher mit erhöhten Plasma-Noradrenalin-Spiegeln, die hingegen nur bei jungen aber nicht bei alten SHR festgestellt werden konnten (*Grobecker et al., 1977; Saavedra et al., 1978; Pak et al., 1981; Grobecker et al., 1982; Szemerédi et al., 1988*).

Es ist anzumerken, dass trotz der wichtigen Rolle des SAS für die Pathogenese der Hypertonie bei SHR natürlich auch das Renin-Angiotensin-System (RAS) und das Endothelin-System als mögliche kausale Faktoren diskutiert werden (*Harap et al., 1992; Luscher et al., 1992; Saavedra et al., 1978; Grobecker et al., 1982*). Die Bedeutung des RAS und die entsprechenden

Beobachtungen zu Veränderungen der Renin-Genexpression und der Plasmaprenin-Aktivität werden unter Punkt 6.1.5 diskutiert.

Während der systemische Widerstand erst ab der 6. Lebenswoche zunimmt, zeigt sich bei SHR bereits im Alter von 4 bis 6 Wochen eine gesteigerte kardiale Auswurfleistung (*Evenwel et al., 1983; Lundin et al., 1980; Smith et al., 1979*), die während der späteren Zunahme des systemischen Widerstands jedoch nahezu unverändert bleibt (*Zicha et al., 1999*).

Die Erhöhung von Herzfrequenz und Auswurfleistung spiegelt sich wiederum in einer signifikanten Zunahme des relativen Herzgewichts und der  $\beta$ -/ $\alpha$ -Myosin-Ratio der 7 Wochen alten SHR. Dennoch ist die sich bei SHR entwickelnde Hypertrophie des linken Myokard-Ventrikels nicht allein durch den Bluthochdruck bedingt. Weitere mitogene Faktoren wie Noradrenalin, Angiotensin II und Endotheline, also Überträgerstoffe der wesentlichen pressorischen Systeme, sind, wie bereits angesprochen, ebenfalls beteiligt (*siehe Grobecker 1991; Grobecker und Krämer, 1996*).

### 6.1.3 Die Bedeutung der Niere für die Hypertonie bei SHR

In den Nieren von SHR kommt es zwischen der 3. und 7. Lebenswoche zu einer Vielzahl charakteristischer Veränderungen. Dazu zählen unter anderem eine verringerte Natrium- und Wassere exkretion (*Bianchi et al., 1975; Beierwaltes et al., 1982a; Nagaoka et al., 1982*), als deren Ursache eine reduzierte glomeruläre Filtration vermutet wird (*Dilley et al., 1984*).

Der bei jungen SH-Ratten erhöhte renale Gefäßwiderstand basiert in erster Linie auf einem gesteigerten Widerstand präglomerulärer Gefäße (*Dilley et al., 1984; Göthberg et al., 1983*), der teilweise durch frühe antihypertensive Therapie normalisiert werden kann. Es hat sich in diesem Zusammenhang gezeigt, dass der Durchmesser der afferenten Arteriolen bei SHR im Alter von 4 bis 6 Wochen kleiner ist, als bei WKY und bei 18 bis 20 Wochen alten Tieren sogar noch weiter reduziert wird (*Gattone et al., 1983; Kimura et al., 1989*).

### 6.1.4 Die Katecholamine der Niere bei SHR

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Pathogenese der genetisch bedingten Hypertonie ist eine gesteigerte Aktivität sympathischer Nerven der Niere (*DiBona et al., 1989; Kline, 1987; Oparil et al., 1987*), welche ebenfalls verbunden ist mit einer Steigerung des renalen Gefäßwiderstandes (*Benetos et al., 1994; Collis et al., 1980*) und/oder einer verstärkten tubulären Natrium-Reabsorption (*Herlitz et al., 1983*). So konnte bei 4 bis 7 Wochen alten SHR ein hoher renaler Noradrenalin-Gehalt festgestellt werden. Dieser geht mit einer geringeren Dichte von  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren einher, deren Zahl in der späteren Entwicklung der spontanen Hypertonie dann zunimmt (*Sanchez et al., 1986*). Zwar liegen Untersuchungen vor, bei welchen auch in den Nieren von 8 und 14 Wochen alten SHR erhöhte Noradrenalin-Konzentrationen nachgewiesen wurden (*Dehner et al., 1990*), jedoch wurden die Tiere hier unmittelbar vor der Tötung noch gewogen (Stress-Situation) und dann mittels nur schwacher Ethernarkose betäubt.

Die im Rahmen der Dissertation untersuchten Tiere wurden mehrere Stunden vor Dekapitation gewogen. Zur inhalativen Narkose wurde Sevofluran<sup>®</sup> verwendet. Bei der nachfolgenden Untersuchung der 7 Wochen alten SHR konnten keine gesteigerten Katecholamin-Konzentrationen im Nierencortex festgestellt werden.

Mehrere Autoren haben diesbezüglich bereits darauf hingewiesen, dass abhängig von der Art der verwendeten Narkose bei gleichen Parametern unterschiedliche oder sogar gegensätzliche Ergebnisse erzielt werden (*Shiono et al., 1976; Yu et al., 1996*). Ein Beispiel hierfür ist die bei



SHR durch schwache Ethernarkose (*Sen et al., 1972*) oder durch Dekapitation ohne Anästhesie (*De Jong et al., 1972*) verursachte Renin-Freisetzung mit daraus resultierender, erhöhter Plasmareninaktivität. Neben der Art der Probengewinnung wird hierfür auch eine - aufgrund der genetischen Heterogenität von SHR unterschiedlicher Herkunft bedingte - Beeinflussung der Genexpression als möglicher Faktor für die oft signifikanten Unterschiede unter ansonsten gleichen Bedingungen diskutiert (*Nabika et al., 1991; Yu et al., 1996*).

### 6.1.5 Das Renin-Angiotensin-System bei SHR

Im Unterschied zum SAS, welches für die akute Modulation des Blutdrucks verantwortlich ist und auch an der Auslösung und Aufrechterhaltung des hohen Blutdrucks pathogenetisch beteiligt ist, dient das RAS zur mittel- bis langfristigen Regulation des Blutdrucks.

Bezüglich der Pathogenese der Hypertonie bei spontan hypertensiven Ratten ist die Rolle des RAS noch weitgehend ungeklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Inhibitoren des RAS, so z.B. ACE-Hemmer (*Muirhead et al., 1978*) und Angiotensin II-Rezeptor-Antagonisten (*Wong et al., 1990*), eine Hypertonieentwicklung bei jungen SHR (*Ferrone et al., 1979*) verhindern können und übereinstimmend zu einer Erniedrigung des Blutdrucks adulter SHR führen. Ebenso wurde eine Überaktivität lokaler RAS in Gehirn (*Ganten et al., 1983*), Nebennieren (*Naruse et al., 1982*) und Gefäßwänden (*Asaad et al., 1982*) als weitere wichtige Determinante für die Pathogenese der Hypertonie nahegelegt.

Im Rahmen der Dissertation wurden sowohl das systemische (Plasma-) RAS, als auch das parakrine, renale RAS untersucht.

Die biologische Aktivität des systemischen RAS wird durch die Rate der Reninfreisetzung aus den Nieren bestimmt, wobei die Plasmarenin-Aktivität (PRA) Indikator der Reninsekretion ist. Es zeigte sich bei 7 Wochen alten SHR eine signifikante Erniedrigung der PRA gegenüber gleichaltrigen WKY. Auch andere Autoren haben bei jungen SHR bereits ab der 5. Lebenswoche eine deutlich supprimierte Plasmarenin-Aktivität feststellen können (*Shiono et al., 1976*). Die Verringerung der PRA wird als kompensatorische Gegenreaktion aufgrund der seit der 5. Woche nachweisbaren Erhöhung des systolischen Blutdrucks angesehen (*Shiono et al., 1976; Sokabe et al., 1966*). Dies basiert auf dem Einfluss des renal-arteriolen Barorezeptors (*Davis, 1971*), der bei erhöhtem Perfusionsdruck der Nieren eine Hemmung der Renin-Freisetzung bewirkt (*Taugner et al., 1984*).

Eine gesteigerte Aldosteronsekretion kommt als Erklärung für die reduzierte PRA nicht in Frage, da die Plasmaaldosteronaktivität gegenüber WKY, wie bei anderen Autoren (*Freeman et al., 1975*) auch, unverändert war.

Bei der Untersuchung des parakrinen RAS der Nieren konnte in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (*Höcherl et al., 2001; Yu et al., 1996*) gezeigt werden, dass die renale Renin mRNA Expression als Indikator der Reninsynthese sowohl bei SHR als auch bei WKY mit zunehmendem Alter abnimmt und dabei zu jedem Zeitpunkt bei SHR niedriger ist als bei WKY. Für die verminderte Reduktion der renalen Renin Genexpression wird ebenfalls eine Barorezeptor-vermittelte, kompensatorische Gegenregulation aufgrund des erhöhten Blutdrucks diskutiert (*Shiono et al., 1976; Moffet et al., 1986*).

Im Hinblick auf die PRA ist die supprimierte renale Reninexpression der SHR eine weitere Erklärung für die niedrigere Plasmarenin-Aktivität der SHR (*Yu et al., 1996*).

### 6.1.6 Die Cyclooxygenase-Isoenzyme

#### 6.1.6.1 Organverteilung der COX-1 und COX-2 bei 7 Wochen alten SHR und WKY

Die auch als Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase bezeichnete Cyclooxygenase ist das Schlüsselenzym der Eicosanoid-Biosynthese. Als bifunktionelles Membranprotein katalysiert sie die Umwandlung von Arachidonsäure in Endoperoxide, welche dann unmittelbar als Substrate für die Prostanoid-Bildung dienen (*Smith et al., 2000*).

Gegenwärtig sind zwei Isoenzyme der Cyclooxygenase bekannt: Cyclooxygenase 1 (COX-1) und Cyclooxygenase 2 (COX-2). Trotz großer Ähnlichkeit in Struktur und enzymatischer Funktion (*O'Banion et al., 1992*), sind sie auf unterschiedlichen Genen lokalisiert und unterscheiden sich in ihrer subzellulären Lokalisation (*Morita et al., 1995*), ihrer Verteilung im Organismus und vor allem in ihrer biologischen Funktion (*Smith et al., 1994*).

Die von *Miyamoto et al., (1976)* erstmals isolierte Cyclooxygenase 1 kommt konstitutiv in vielen Körpergeweben vor, z.B. in Niere, Magen, glatten Muskelzellen und Blutplättchen (*Simmons et al., 1992; O'Neill et al., 1993*). Sie ist dort basal nachweisbar und sorgt für die Bereitstellung des physiologischen Bedarfs an Prostanoiden. Bei der im Rahmen der Dissertation durchgeführten Untersuchung der Organverteilung konnte COX-1 mRNA ohne signifikante Unterschiede zwischen SH- und WKY-Ratten in allen Organen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Genexpression von WKY wurden zusätzlich durch eine entsprechende Proteinexpression bestätigt.

Auch die Untersuchung der Cyclooxygenase 2-Organverteilung bestätigt zum Teil bereits bekanntes Wissen. Es zeigte sich, dass die 1989 durch *Simmons et al.* entdeckte, und damals in erster Linie als induzierbares Enzym angesehene COX-2 in einigen wenigen Organen wie Gehirn, Lunge und Niere konstitutiv exprimiert wird (*Feng et al., 1993; Harris et al., 1994*).

Im Gegensatz zur Organverteilung der COX-1, konnte für die der COX-2 signifikante Unterschiede zwischen SHR- und WKY-Tieren aufgezeigt werden.

Im Gehirn der 7 Wochen alten SHR konnten erstmals signifikant niedrigere COX-2 mRNA Spiegel festgestellt werden. Die Bedeutung ist zum jetzigen Zeitpunkt jedoch unklar. Zur Klärung des Sachverhaltes bedarf es daher weiterer Untersuchungen.

Über die ebenfalls beobachtete, signifikante Verringerung der renocortikalen COX-2 mRNA bei SHR wurde bereits von anderen Autoren (*Höcherl et al., 2001*) berichtet. Sie wird unter Punkt 6.1.6.2 diskutiert.

#### 6.1.6.2 COX-1 und COX-2 in den Nieren von SHR und WKY

In den Nieren war die erste auffallende Beobachtung, dass sich die Expressionsrate der beiden Cyclooxygenase-Isoenzyme von der inneren Medulla zum Nierencortex hin stark verringert.

Dies stimmt mit Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (*Jensen und Kurtz, 1997; Smith und Bell, 1978; Yang et al., 1998*) an Ratten und Mäusen überein.

Hinsichtlich der Lokalisation der beiden Isoenzyme innerhalb der Niere existieren jedoch wichtige Unterschiede.

Für Cyclooxygenase 1 konnte anhand von Hybridisierungsexperimenten und immunhistochemischen Untersuchungen gezeigt werden, dass sie in der Niere vor allem in Arterien, Arteriolen, Glomeruli und Sammelrohrzellen vorkommt. Im proximalen und distalen

Tubulus, der Henleschen Schleife und der Macula densa konnte hingegen keine COX-1 Immunoreaktivität nachgewiesen werden (*Smith et al., 1978*).

Hingegen ist für die Cyclooxygenase 2 eine basale Expression im Nierencortex nicht nur in Arteriolen und den Podozyten der Glomeruli nachgewiesen worden, sondern auch in den Zellen der Macula densa und in verstreuten Zellen des dicken, aufsteigenden Astes der Henleschen Schleife (TALH) (*Nantel et al., 1999; Komhoff et al., 1997; Vio et al., 1997; Harris et al., 1994*). Im Nierenmark wurde COX-2 im Sammelrohr und in den interstitiellen Zellen lokalisiert (*Komhoff et al., 1997*).

Bei Betrachtung der Altersentwicklung zeigte sich ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Cyclooxygenasen.

Während es mit zunehmendem Alter weder bei SH- noch bei WKY-Ratten zu einer signifikanten Veränderung der Gen- und Proteinexpression der COX-1 kam und dabei die COX-1 Expression bei SHR zu jedem Zeitpunkt der von WKY entsprach, zeigte sich mit zunehmendem Alter bei beiden Stämmen eine signifikante Verringerung der COX-2 mRNA in Nierenrinde und äußerer Medulla, bei unveränderter COX-2 Expression der inneren Medulla.

Die Ergebnisse zur Genexpression der COX-2 entsprechen somit den früheren Untersuchungen an älteren WKY- und SH-Ratten von Höcherl et al. (2001) und histologischen Untersuchungen (*Harris et al., 1994*).

Neu sind die Ergebnisse zur Proteinexpression. Hier konnte bei beiden Stämmen gezeigt werden, dass sich mit zunehmendem Alter, entsprechend der mRNA, auch das COX-2 Protein des Nierencortex deutlich erniedrigt. Während die COX-2 Genexpression im Nierencortex bei 7 Wochen alten SHR signifikant geringer war als bei WKY gleichen Alters, unterschied sich überraschender Weise die Proteinexpression beider Stämme zu keinem Zeitpunkt. So zeigt sich bei SHR gegenüber WKY in der Frühphase der Hypertonieentwicklung eine verringerte COX-2 Genexpression bei identischer Proteinexpression.

### 6.1.6.3 Zusammenhang zwischen COX-2 und Renin

Die Rolle der COX-2 für die Reninsekretion und -synthese ist noch unklar. Einige Berichte haben eine Beteiligung der Prostanoiden an der Regulation der Synthese und Sekretion von Renin im juxtaglomerulären (JG) Apparat und an der Regulation des tubulären Salz- und Wasserhaushaltes nahegelegt (*Hackenthal et al., 1990; Schnermann et al., 1998*).

Die Feststellung, dass die Expression der Cyclooxygenase 2 in den TALH- und Macula densa Zellen physiologisch reguliert wird durch die Salzzufuhr, den renalen Perfusionsdruck und durch Angiotensin II und somit auffallende Parallelen zur Expression von Renin zeigt, ließ vermuten, dass die von COX-2 gebildeten Prostanoiden möglicherweise an der Kontrolle des Renin-Systems beteiligt sind (*Harris et al., 1994; Hartner et al., 1998; Cheng et al., 1999; Wolf et al., 1999*). Es konnte gezeigt werden, dass es unter Bedingungen eines stark stimulierten Renin-Angiotensin-Systems zu einer signifikant gesteigerten Expression der COX-2 im Bereich der Macula densa kommt (*Wolf et al., 1999*).

Basierend auf Experimenten mit den selektiven COX-2 Blockern (*Cheng et al., 1999; Harding et al., 2000; Traynor et al., 1999*) und COX-2 Knock-out Mäusen (*Cheng et al., 2001; Yang et al., 2000*) wurde schließlich nahegelegt, dass die COX-2 Aktivität in der Macula densa eine ganz essentielle Trigger- und Regulationsfunktion für die Renin-Synthese und Renin-Sekretion hat. Zum Beispiel haben Untersuchungen mit dem COX-2 Hemmstoff SC-58236, welcher für 1

Woche oral verabreicht wurde, gezeigt, dass mit dieser Substanz sowohl die Renin- als auch die COX-2 Genexpression vermindert wurde (*Cheng et al., 1999*). Auch war bei COX-2 Knock-out Mäusen eine Stimulation des Reninsystems durch Salzangel nicht möglich (*Yang et al., 2000*).

Es wurden jedoch auch von einigen anderen Forschergruppen berichtet, dass selektive COX-2 Hemmung keinen Einfluss auf die Reninsynthese und -sekretion hat (*Mann et al., 2001; Rossat et al., 1999; Rodriguez et al., 2000; Höcherl et al., 2001*). Beispielsweise zeigten Höcherl et al. (2001) im Tierexperiment an Ratten, dass der im Handel befindliche COX-2 Inhibitor Celecoxib einen durch den AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten Candesartan hervorgerufenen Anstieg von Renin mRNA, COX-2 mRNA und Plasmapreninaktivität nicht beeinflusst. Dies entsprach früheren Beobachtungen mit den COX-2 Blockern Celecoxib und Nimesulid bei Menschen und Hunden unter Salzangel-Ernährung: es hatte sich gezeigt, dass COX-2 Hemmstoffe die Funktion des renalen Tubulus beeinflussen, ohne die Plasmapreninaktivität zu beeinträchtigen (*Rodriguez et al., 1999; Rossat et al., 1999*).

Im Rahmen der Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei SHR und WKY die Renin- und COX-2 Genexpression mit zunehmendem Alter geringer werden.

Die Reningenexpression der SHR ist dabei zu jedem Zeitpunkt niedriger als bei WKY. Hingegen sind die Reninsekretion (PRA) und auch die COX-2 Genexpression nur bei 7 Wochen alten SHR erniedrigt gegenüber der normotensiven Kontrolle. Außerdem zeigten sich, verglichen mit WKY, trotz unterschiedlicher COX-2 Genexpression keine Unterschiede in den COX-2 Proteinspiegeln.

Diese Ergebnisse zeigen zumindest, dass die mRNA Expression von Renin und COX-2 sehr koordiniert abläuft. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Renin- und die COX-2 Genexpression von einem gemeinsamen Mechanismus gesteuert werden.

Wichtige neue Erkenntnisse über die komplexen Zusammenhänge zwischen COX-2 Expression und basaler Renin-Sekretion und -Synthese haben sich von den im zweiten und dritten Teil der im Rahmen der Dissertation durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen ableiten lassen. Sie werden unter Punkt 6.2 und 6.3 diskutiert.

#### **6.1.6.4 Prostaglandin E<sub>2</sub> in den Nieren junger SHR**

An der Kontrolle des renalen Blutflusses, der glomerulären Filtration und der Salzausscheidung sind auch die von der Cyclooxygenase gebildeten Prostaglandine beteiligt. Es handelt sich hierbei um eine heterogene Gruppe von biologisch aktiven C<sub>20</sub>-Fettsäuren, die von der Niere synthetisiert und freigesetzt werden, und die von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Nierenfunktion sind (*Walker et al., 1987*).

Es ist bekannt, dass Prostaglandine sowohl in vitro, als auch in vivo potente Stimulatoren der Reninsekretion sind (*Keeton et al., 1981*). Besonders die aus der Macula densa stammenden Prostaglandine E<sub>2</sub> und Prostacyclin PGI<sub>2</sub> stimulieren die Reninsekretion und Reningenexpression auf der Ebene der JG-Zellen, welche den Macula densa Zellen direkt benachbart sind (*Beierwaltes et al., 1982b; Freeman et al., 1984*). Auch konnte gezeigt werden, dass das von der Cyclooxygenase gebildete, vasodilatorische Prostaglandin E<sub>2</sub> eine direkte stimulatorische Wirkung auf die Renin Genexpression und die Reninsekretion von isolierten juxtaglomerulären Zellen hat (*Jensen et al., 1996*).

Während einige den Prostaglandinen auch eine essentielle Rolle für die Barorezeptorfunktion zusprechen (*Berl et al., 1979; Imagawa et al., 1985*) und bei dem Einsatz von Cyclooxygenase-

Inhibitoren eine Abschwächung des Anstiegs der Reninsekretion nach unilateraler Nierenarterienstenose beobachtet haben (*Schricker et al., 1995a; Schricker et al., 1995b*), halten andere dies jedoch für unwahrscheinlich (*Anderson et al., 1982; Ehmke et al., 1993*).

Bei der Untersuchung der renokortikalen Prostaglandin E<sub>2</sub> Spiegel des Nierencortex waren trotz der im Alter bei SHR verringerten basalen Renin- und COX-2 mRNA Spiegel keine altersabhängigen oder artspezifischen Unterschiede festzustellen. Im Nierencortex der 7 Wochen alten SHR entsprachen COX-2 Proteinexpression und Prostaglandin E<sub>2</sub> Spiegel der normotensiven WKY Kontrolle.

Diesbezüglich erwähnenswert ist eine interessante Abnormalität in den Nieren junger SHR: die übersteigerte Reaktivität renaler Gefäße auf Vasokonstriktoren wie Angiotensin II oder Thromboxan A<sub>2</sub> (*Chatziantoniou et al., 1990*). Sie beruht nicht nur auf einer gesteigerten Dichte von AT<sub>1</sub>-Rezeptoren (*Haws et al., 1994*) und Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptoren (*Chatziantoniou et al., 1991*) im Glomerulum, bzw. auf einer gesteigerten AT<sub>1A</sub> mRNA Genexpression der Nieren (*Höcherl, 2000*), sondern insbesondere auch auf der veränderten Fähigkeit von PGE<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub>, als vasodilatatorischer Gegenspieler der renalen Vasokonstriktoren auf die renalen Gefäße zu wirken (*Chatziantoniou et al., 1992*). Ursache hierfür ist ein Defekt der G<sub>s</sub>-Protein-abhängigen cAMP-Bildung (*Chatziantoniou et al., 1993; Chatziantoniou et al., 1995*).

### 6.1.7 Die NO-Synthase-Isoenzyme: eNOS und nNOS bei SHR und WKY

#### 6.1.7.1 NO in der Frühphase der Hypertonieentwicklung bei SHR

Die Vermutung, dass der Hypertonie der SH-Ratten ein Ungleichgewicht zwischen Vasokonstriktoren und Vasodilatoren zugrunde liegt, wird unterstützt durch die Tatsache, dass es sowohl bei Blockade des Angiotensin-Systems (*Cachofeiro et al., 1995*) als auch bei Stimulation des NO-Mechanismus mit L-Arginin (*Lin et al., 1997; Susic et al., 1999*) zu einer Erniedrigung des Blutdrucks und zu einer Verbesserung der Endothelfunktion kommt (*Verhagen et al., 2001*).

Die Daten bezüglich der Bedeutung von NO für die Blutdruck-Homöostase in der frühen Phase der genetischen Hypertonie sind dennoch unklar und widersprüchlich. Ein Defizit an NO konnte nicht nachgewiesen werden (*Verhagen et al., 2001*). Sowohl die eNOS-Expression der Aorta als auch die Plasma-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Spiegel sind in 4 Wochen alten SHR unverändert und ihre Veränderung tritt erst bei älteren Tieren (ca. 12. Lebenswoche) mit bestehender Hypertonie auf (*Chou et al., 1998*).

Die Bildung von NO in glatten Gefäßmuskelzellen nach Stimulation der iNOS ist bei prähypertensiven SHR sogar gesteigert (*Xiao et al., 1996*). Ebenso wurde bei unreifen SHR über gesteigerte NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Ausscheidung im Urin berichtet, welche mit einer erhöhten vaskulären eNOS- und renalen iNOS-Proteinexpression verbunden war (*Vaziri et al., 1998*). Somit ist der L-Arginin-NO-Mechanismus in jungen SHR sowohl vor als auch nach dem Eintreten der Hypertonie hochreguliert (*Ziccha et al., 1999*). Dies legt nahe, dass die Entwicklung der Hypertonie bei SHR nicht durch einen primären Defekt in der NO-Bildung verursacht wird (*Ziccha et al., 1999*).

Die einzige bisher berichtete Beeinträchtigung der NO-Synthese von prähypertensiven SH-Ratten betrifft die konstitutive eNOS. Sie benötigt bei hypertensiven Ratten höhere Mengen des Cofactors Tetrahydrobiopterin und produziert in der Aorta 4 Wochen alter SHR weniger NO aber mehr Superoxid-Anionen als bei gleichaltrigen WKY (*Cosentino et al., 1998*). Obwohl eine gesteigerte Bildung von Superoxid-Anionen zur vermehrten Desaktivierung von NO in SHR

beiträgt (*Schnackenberg et al., 1998*), ist der relative Beitrag von Stickstoffmonoxid zur Aufrechterhaltung des Blutdrucks bei SHR und WKY mindestens bis zum Alter von 24 Wochen gleich (*Minami et al., 1995; Yamazaki et al., 1991*).

Die im Rahmen der Dissertation gewonnenen neuen Erkenntnisse über Veränderungen der Gen- und Proteinexpression der konstitutiven-NO-Synthase Isoenzyme in der Frühphase der Hypertonie werden im Folgenden diskutiert.

#### **6.1.7.2 Organverteilung von eNOS und nNOS bei 7 Wochen alten SHR und WKY**

Im Rahmen der Untersuchung von Patienten mit essentieller Hypertonie zeigte sich nach Agonisten-Stimulation in den meisten (*Panza et al., 1995*), jedoch nicht in allen Studien (*Cockcroft et al., 1994*), eine abgeschwächte Endothel-abhängige Vasorelaxation im peripheren Blutkreislauf.

Während in der Aorta spontan hypertensiver Ratten eine Schwächung der Endothel-abhängigen Relaxation nachweisbar ist, liegt hingegen in der Koronararterie der SHR eine normale endothel-abhängige Vasodilatation und eine gesteigerte Expression der endothelialen NO-Synthase vor. Die Expression der NO-Synthasen und die Wirkung von Stickstoffmonoxid scheinen daher bei SHR organspezifisch zu sein (*Welch et al., 1999*).

Anhand der Untersuchung der Gen- und Proteinexpression der endothelialen und neuronalen NO-Synthase konnte diese Vermutung bestätigt werden.

Die Genexpression der eNOS konnte in allen Organen 7 Wochen alter SHR und WKY nachgewiesen werden. Auch die Genexpression der nNOS konnte mit Ausnahme der Leber in allen Geweben gezeigt werden. Die e- und nNOS Proteinexpression entsprach dabei der Genexpression der WKY Tiere. Die einzige Ausnahme war die Proteinexpression des Nierencortex: sie war bei eNOS nicht und bei nNOS nur schwach nachweisbar (siehe 6.1.7.3).

Auffallend sind die hohen eNOS Spiegel im Herzen die bei SHR signifikant erniedrigt sind verglichen mit WKY. Eine einzige Veröffentlichung (*Naruse et al., 1999*) hatte mit Hilfe des Protection Assays für 12 Wochen alte Stroke-Prone SHR gleiche eNOS/GAPDH mRNA Spiegel wie bei WKY nachweisen können. Weitere Untersuchungen liegen zum jetzigen Zeitpunkt auf diesem Gebiet nicht vor.

Über die Bedeutung der NO-Synthasen im Gehirn ist hingegen mehr bekannt. Die NOS-Enzym-Aktivität ist nach bisherigen Erkenntnissen im Gehirn generell höher als in allen anderen Geweben und konnte in allen Gehirnregionen nachgewiesen werden (*Millatt et al., 1999*). Während nur endotheliale Zellen eNOS exprimieren, wird die nNOS durch Neurone und Astrocyten gebildet (*Millatt et al., 1999*).

Erwartungsgemäß konnten die im Rahmen der Dissertation durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die höchsten nNOS Spiegel im Gehirn vorkommen. Auch wird deutlich, dass die eNOS hier wesentlich schwächer exprimiert wird.

Während das von der nNOS gebildete NO als Neurotransmitter dient und eine wichtige Rolle bei Lern- und Erinnerungsvorgängen und bei der Nozizeption spielt, hat das von der eNOS abstammende NO eine andere Bedeutung. Es dient in der cerebralen Zirkulation als Vasodilatator und hat durch die Aufrechterhaltung des Blufflusses eine Schutzfunktion während einer Ischämie des Gehirns (*Huang et al., 1996*).

Auch in den Nebennieren war die nNOS Gen- und Proteinexpression deutlich stärker als die der eNOS. Interessant ist die Feststellung, dass die nNOS Genexpression in den Nebennieren der 7

Wochen alten SHR signifikant höher war als bei gleichaltrigen WKY. Man vermutet in diesem Zusammenhang, dass das von der eNOS gebildete NO für den tonisch-vasodilatierenden Effekt innerhalb der Nebennieren verantwortlich ist (*Breslow et al., 1993*). Außerdem hat NO nachweislich einen inhibitorischen Effekt auf die basale Katecholamin-Freisetzung der Nebennieren. Die verantwortliche NOS Isoform ist jedoch noch nicht identifiziert (*Ward et al., 1996*). Mehrere Autoren legen auch eine hemmende Wirkung von NO auf die Aldosteronsynthese der Nebennieren nahe (*Del Punta et al., 1996*). Aufgrund diverser Diskrepanzen bezüglich des Effekts von NO auf die Aldosteron-Synthese bei in vivo und in vitro Studien bedarf es noch weiterer Untersuchungen zu deren Klärung (*Millatt et al., 1999*).

### 6.1.7.3 Lokalisation von eNOS und nNOS in den Nieren

Innerhalb der Niere kommt es, wie schon bei den Cyclooxygenase-Isoenzymen beobachtet, vom Nierencortex zur Nierenpapille hin zu einer zonalen Zunahme der detektierbaren e- und nNOS Gen- und Proteinexpression. Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass die renale Medulla von Hunden (*Biondi et al., 1990*) und Ratten (*Moridani et al., 1996*) eine größere Fähigkeit zur NO-Synthese hat als der renale Cortex (*Mattson et al., 2000*). Experimente von *Wu et al. (1999)* haben aufgezeigt, dass die Gesamtaktivität der NO-Synthasen in der inneren Medulla 25 mal höher ist als in der Nierenrinde. Diese Beobachtung wurde auf Proteinebene bestätigt. Mittels Immunoblot konnten Mattson und Higgins 1996 relativ große Mengen immunoreaktiver eNOS-, nNOS- und iNOS-Proteine im Gesamthomogenat der inneren Medulla nachweisen. Hingegen war mit der selben Technik keine der Isoformen in Homogenaten der Nierenrinde detektierbar (*Mattson et al., 1996*). Auch im Rahmen der Dissertation war das eNOS Protein im Nierencortex der WKY-Tiere nicht nachweisbar. Beim nNOS Protein zeigte sich jedoch eine sehr schwache Bande.

Wie die Cyclooxygenase-Isoenzyme sind auch die untersuchten NOS-Isoenzyme an unterschiedlichen Stellen der Niere zu finden. *Briggs et al.* konnte 1993 zeigen, dass die Macula densa reich an der neuronalen Isoform nNOS ist, während diese in den Glomeruli, dem Mesangium oder den juxtaglomerulären Zellen kaum exprimiert wird. Die endotheliale NO-Synthase wurde hingegen hauptsächlich in den Glomeruli und den Blutgefäßen (Endothel der afferenten Arteriole) nachgewiesen (*Ujiie et al., 1994*).

### 6.1.7.4 eNOS und nNOS in den Nieren bei SHR und WKY: Gemeinsamkeiten und Unterschiede in Gen- und Proteinexpression

Bei der Untersuchung der Genexpression von endothelialer und neuronaler NO-Synthase unterlagen die Isoenzyme in gleichen Nierenzonen auch identischen Veränderungen. Dabei waren die e- und nNOS mRNA Spiegel 3 Wochen alter SHR mit denen gleichaltriger WKY-Tiere in der jeweiligen Zone identisch. Auch in Nierenrinde und äußerer Medulla zeigten sich bei 3 und 7 Wochen alten WKY keine signifikanten Unterschiede.

Bei 7 Wochen alten SHR kam es jedoch in Cortex und OM zu einer signifikanten Verringerung der eNOS- und nNOS mRNA Spiegel gegenüber 3 Wochen alten SHR und gegenüber 7 Wochen alten WKY. Es zeigt sich also bereits nach 3-wöchiger Hypertonie ein signifikanter Unterschied zu WKY. Von anderen Autoren in diesem Zusammenhang durchgeführte Untersuchungen der mRNA Genexpression von SHR gleichen Alters liegen in der derzeit zur Verfügung stehenden Literatur nicht vor.

Die Proteinexpression der eNOS in den Nieren von 3 und 12 Wochen alten SHR und WKY wurde von *Vaziri et al. (1998)* untersucht.

Während hier in den Nieren der prähypertensiven SHR die gleiche Menge eNOS Protein wie bei WKY detektiert wurde, zeigten die 12 Wochen alten SHR signifikant höhere eNOS und iNOS Protein Spiegel in den Nieren als gleich alte WKY. Auch *Welch et al. (1999)* haben bei gealterten SHR eine erhöhte Expression von nNOS im Nierencortex, sowie eine ebenfalls erhöhte Expression von eNOS in den Glomeruli festgestellt. Da die Zunahme der konstitutiven NOS-Isoformen mit einer gesteigerten mRNA-Abundanz verbunden war, vermuteten die Autoren eine Regulation auf Transkriptionsebene.

Im Rahmen der Dissertation zeigte sich, dass sich mRNA und Protein im Nierencortex entgegengesetzt verhalten. So war bei 3 Wochen alten SHR- trotz gleicher e- und nNOS mRNA wie bei WKY- das zugehörige Protein stets höher als bei WKY. Eine altersabhängige Verringerung des Proteins fand entsprechend der Verringerung der mRNA nur bei SHR statt. Dies deutet ebenso auf eine Regulation auf Ebene der Transkription hin. Bei 7 Wochen alten SHR entsprach die Proteinmenge beider Isoenzyme - trotz signifikant niedrigerer SHR-mRNA - der Proteinmenge gleichaltriger WKY.

Zur Erklärung der gegensätzlichen mRNA- und Proteindaten ist Folgendes anzuführen: bei Infusionsstudien mit Angiotensin II konnte an Ratten nach einer akuten Infusion über 110 Minuten gezeigt werden, dass es zu einem Anstieg der eNOS mRNA der Niere kam, jedoch ohne Veränderung des eNOS Proteins. Im Gegensatz dazu konnte nach 10 Tage langer chronischer Infusion gesteigerte eNOS Protein Spiegel, aber unveränderte eNOS mRNA Spiegel nachgewiesen werden (*Hennington et al., 1998*). Zwar wurden diese Untersuchungen mit Homogenaten der ganzen Niere durchgeführt, es zeigt sich aber dennoch, dass sich Gen- und Proteinexpression grundsätzlich konträr verhalten können.

In der inneren Medulla, welche die größte Genexpression beider NO-Synthasen zeigte, und welche sich wie bereits erwähnt durch die stärkste Gesamtaktivität der 3 NO-Synthasen auszeichnet, konnten weder altersabhängige noch stammesspezifische Unterschiede gemessen werden.

### 6.1.7.5 NO, COX-2 und Renin

Zur Stimulation der Renin-Synthese ist neben den Prostaglandinen auch NO fähig. Es wird im Bereich der juxtaglomerulären Zellen, dem Entstehungsort von Renin, sowohl im Endothel der afferenten Arteriole (eNOS) als auch in der Macula densa (nNOS) gebildet. Dass für die Stimulation des Reninsystems in erster Linie das vom Endothel gebildete NO von Bedeutung ist, konnte anhand von e- und nNOS-Knock-out Mäusen gezeigt werden (*Wagner et al., 2000*).

Ein wichtiger Unterschied zwischen beiden Isoformen besteht darin, dass nur die Expression der neuronalen NO-Synthase unter verschiedenen Vorraussetzungen wie salzarme Nahrung, ACE-Blockade oder renale Hypoperfusion parallel mit der Renin- und der COX-2 Expression reguliert wird (*Cheng et al., 1999; Wolf et al., 1999; Yang et al., 1998; Singh et al., 1996; Schrick et al., 1996; Bosse et al., 1995*).

*Castrop et al. (2000)* konnten diesbezüglich jedoch den Nachweis erbringen, dass weder unter basalen Bedingungen noch unter Salzangel eine wechselseitige Abhängigkeit der Genexpression von Cyclooxygenase 2 und neuronaler NO-Synthase besteht. Es konnte weder der COX-2 Inhibitor Rofecoxib die basale noch die durch Salzangel stimulierte nNOS Expression



hemmen, noch hatte der NO-Synthese Blocker L-NAME ( $\text{N}^{\text{G}}$ -nitro-L-arginin-methylester) einen Einfluss auf die basale oder stimulierte COX-2 Expression.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass es in der Frühphase der Hypertonieentwicklung bei SHR zu einer mit zunehmendem Alter gleichzeitig stattfindenden, signifikanten Verringerung der Renin-, COX-2- und e- bzw. nNOS-Genexpression kommt. Die Genexpression 7 Wochen alter SHR ist nach 3 wöchiger Hypertonie auch gegenüber 7 Wochen alten WKY signifikant erniedrigt. Die zugehörigen Proteinmengen der COX-2 und e- bzw. nNOS unterscheiden sich jedoch im Alter von 7 Wochen nicht signifikant.

Da keine Plasma- oder Urinmetaboliten von NO bestimmt wurden, kann man nicht sagen, ob sich trotz gleicher Proteinspiegel Unterschiede in der Aktivität der NO-Synthasen und daraus resultierende Unterschiede in der NO-Synthese ergeben. Andere Autoren haben jedoch in diesem Zusammenhang bereits über gesteigerte  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ -Ausscheidung im Urin von 3 und 12 Wochen alten SHR berichtet (*Vaziri et al., 1998*).

Aufgrund dieser unterschiedlichen Ergebnisse zur Gen- und Proteinexpression bedarf es zur endgültigen Abklärung weiterer Untersuchung der renalen NO-Synthase Gen- und Proteinexpression unter Verwendung identischer Methoden.

## 6.2 Diskussion der Ergebnisse zur Immunsuppressiva-induzierten Hypertonie

### 6.2.1 Das Versuchsmodell

Die auf zellulärer und molekularer Ebene aus der Calcineurin-Hemmung resultierenden Veränderungen, besonders in Herz und Niere, sind zum jetzigen Zeitpunkt größtenteils ungeklärt. Der Schwerpunkt der Dissertation lag deshalb auf der Untersuchung der durch die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und FK506 verursachten kardiovaskulären und renalen Veränderungen.

Um beurteilen zu können, ob die mit der systemischen Calcineurin-Hemmung verbundenen Veränderungen spezifisch sind, war neben den unbehandelten Kontrolltieren eine zweite Kontrollgruppe nötig. Da die Wirkungen des Rapamycin-Derivats SDZ-RAD (40-O-(2-Hydroxyethyl)-Rapamycin) durch Calcineurin-unabhängige Signalmechanismen vermittelt werden, ist es hierfür hervorragend geeignet und wurde in diesem Zusammenhang alternativ zu Rapamycin (*Ryffel et al., 1994; Boluyt et al., 1997*) verwendet.

### 6.2.2 Die verwendeten Dosierungen

Nach 10-tägiger oraler Applikation von Placebo oder Immunsuppressivum (Cyclosporin A (15mg/kg/Tag), Tacrolimus (5mg/kg/Tag), SDZ-RAD (1mg/kg/Tag)), wurden die zu diesem Zeitpunkt 7 Wochen alten WKY-Ratten getötet. Die verwendeten Dosierungen sind zwar um ein Vielfaches höher als die klinisch relevanten Dosierungen beim Menschen, jedoch für Tierversuche mit Ratten durchaus gebräuchlich. Während z.B. die Tacrolimus-Dosis beim Menschen 0,2-0,3 mg/kg/Tag beträgt (*The US Multicenter FK506 Liver Study Group, 1994*), bedarf es bei der Ratte mehr als das 50-fache der menschlichen Dosierung (*Ochiai et al., 1991*). 5 mg/kg/Tag (*Takahara et al., 1991*) und 6 mg/kg/Tag (*Laskow et al., 1996*) sind Berichten nach ausreichend, um bei Ratten die im Humanbereich nach Transplantation angestrebten Blutspiegel zu erzeugen. Die immunsuppressive Wirksamkeit wurde an der Ratte bewiesen; Transplantatabstoßungen können bereits mit 5 mg/kg/Tag verhindert werden. Auch die Wirksamkeit von SDZ-RAD ist bei oraler Gabe von Dosierungen zwischen 1 und 5 mg/kg/Tag in relevanten Tiermodellen, u.a. in Modellen von Autoimmunerkrankungen und mehreren Allotransplantationsmodellen, nachgewiesen (*Schuler et al., 1997*).

### 6.2.3 Unspezifische Effekte der systemischen Immunsuppressiva-Applikation

Übereinstimmend mit Berichten anderer Autoren kam es durch die Behandlung mit CsA und FK506 zu einer verringerten Gewichtszunahme der jungen Versuchstiere, einer reduzierten lokomotorischen Aktivität und einem kranken Gesamteindruck (*Takeda et al., 1999; Zhang et al., 2002; Wellenhofer, 1994*). Bei FK506 war die Gesamtverfassung am schlechtesten und verbunden mit einer signifikanten Abnahme des Futterverbrauchs. Als Ursachen für diese Veränderungen werden u.a. der erhöhte Sympathikustonus, die Störung des Glucosestoffwechsels und gastrointestinale Störungen (v.a. Durchfälle) diskutiert (*Wellenhofer, 1994*).

Die Tiere der SDZ-RAD Gruppe waren hingegen lebhaft und zeigten ein den Kontrolltieren entsprechendes Verhalten. Ihre Körpergewichtszunahme war erst am letzten Versuchstag deutlich geringer als die der Kontrollgruppe.

## 6.2.4 Einfluss der Immunsuppressiva auf das kardiovaskuläre Systems

### 6.2.4.1 Blutdruck und Herzfrequenz

Bei der Untersuchung des Blutdrucks konnte bei den Calcineurin-Inhibitoren ab dem 8. Behandlungstag ein signifikanter Anstieg des systolischen Blutdrucks festgestellt werden. Die Ursachen der durch Calcineurin-Inhibitoren induzierten Hypertonie sind vielfältig und entsprechen größtenteils den für die Nephrotoxizität diskutierten Faktoren.

Die Hypertonie (und Nephrotoxizität) von Calcineurin-Inhibitoren ist mit einem gesteigerten systemischen, koronaren und renalen Gefäßwiderstand verbunden. Charakteristisch ist die in diesem Zusammenhang nachgewiesene, reduzierte Freisetzung der vasodilatorischen Prostaglandine E<sub>2</sub> und I<sub>2</sub> (Darlametsos *et al.*, 2000a, 2000b; Bennett *et al.*, 1988), bei gleichzeitig gesteigerter Bildung vieler vasokonstriktorischer Faktoren, wie z.B. Renin-Angiotensin (Siegl *et al.*, 1982), Thromboxan A<sub>2</sub> (Rodgers *et al.*, 1988; Darlametsoso *et al.*, 2000a), Endothelin (Darlametsos *et al.*, 2000b; Bunchman *et al.*, 1991) und Noradrenalin (Duruibe *et al.*, 1990; Grobecker *et al.*, 1995; Lyson *et al.*, 1993).

Die bei beiden Calcineurin-Inhibitoren zu beobachtende Blutdruckerhöhung und Tachykardie deutet auf eine gesteigerte sympatho-adrenale Aktivität hin (Grobecker *et al.*, 1995; Wellenhofer *et al.*, 1994; Lyson *et al.*, 1993). Experimente der genannten Autoren konnten zeigen, dass der Blutdruckanstieg durch chemische Sympathektomie mit 6-Hydroxydopamin signifikant vermindert werden kann. Der aus CsA-Gabe resultierende Blutdruckanstieg kann ebenso durch eine Entleerung der Katecholaminspeicher mittels Reserpin oder durch eine Prazosin-induzierte Blockade von  $\alpha_1$ -Rezeptoren verringert werden (Grobecker *et al.*, 1995).

Bei den SDZ-RAD-Tieren war der Blutdruck bereits ab dem 4. Behandlungstag deutlich erhöht. Wegen der frühzeitig einsetzenden, starken Blutdrucksteigerung wurde die anfangs den Kontrolltieren entsprechende Herzfrequenz zum letzten Behandlungstag - vermutlich aufgrund Barorezeptor-vermittelter Gegenregulation - signifikant verringert.

Die extreme Blutdrucksteigerung unter SDZ-RAD war überraschend. Da der hypertensive Effekt der Calcineurin-Inhibitoren zum größten Teil als Folge der Calcineurin-Hemmung angesehen wird (Zhang *et al.*, 2000), wurde für mTOR-Hemmer bislang nur ein geringer blutdrucksteigernder Effekt diskutiert. Dennoch hat sich in Humanstudien auch für Rapamycin in Dosierungen von 2 und 5 mg/Tag eine Hypertonie-Inzidenz von 44 bzw. 37 % gezeigt (Kahan *et al.*, 2001). In einer Studie der Sirolimus European Renal Transplant Study Group wurden Patienten mit CsA oder Rapamycin jeweils in Kombination mit Azathioprin und Corticosteroiden behandelt. Es kam mit Rapamycin bei 17 %, mit CsA bei 33 % der Patienten zu Hypertonie (Groth *et al.*, 1999). Eine blutdrucksteigernde Wirkung von SDZ-RAD in Tier- oder ersten Humanstudien ist hingegen noch nicht berichtet worden.

### 6.2.4.2 $\beta$ -/ $\alpha$ -Myosin-Ratio

Während sich das relative Herzgewicht von Kontroll- und Verumgruppe nicht unterschied, war die Myosin-Ratio bei allen Immunsuppressiva signifikant erhöht. Zu einer besonders starken Veränderung dieses Parameters führte die Behandlung mit Tacrolimus.

Zu der Bedeutung der Calcineurin-Hemmung für die Entwicklung einer links-ventrikulären Herzhypertrophie finden sich in der derzeitigen Literatur widersprüchliche Aussagen. Experimente mit Cardiomyocyten und transgenen Mäusen sprechen dafür, dass Calcineurin-

Inhibitoren eine Hypertrophie verhindern (*Zhang et al., 2002; Lim et al., 2000*). In klinischen Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass es bei einigen Patienten unter Tacrolimus-Therapie zu einer reversiblen, mit den FK506-Blutspiegeln korrelierenden, myokardialen Hypertrophie kommt (*Nakata et al., 2000*). In Hasenherzen wurde nachgewiesen, dass durch FK506-induzierte Calcineurin-Hemmung die Aktivität der kardialen NO-Synthase reduziert wird (veränderte Phosphorylierung des Enzyms). Außerdem führt FK506 zur Aktivierung der p70 S6 Kinase, welche die Proteinsynthese reguliert und daher eine wichtige Rolle in der Herzhypertrophie spielt. *Minamino et al. (2000)* legen nahe, dass beide Prozesse von Relevanz für die bei einigen Patienten unter FK506 zu beobachtende Hypertrophie sind.

Auch mit SDZ-RAD kam es zu einer deutlich erhöhten Myosin-Ratio. Im Gegensatz zu Calcineurin-Inhibitoren blockieren jedoch die mTOR-Hemmer SDZ-RAD und Rapamycin die Aktivierung der p70 S6 Kinase (*Schuler et al., 1997; Sehgal, 1998*). Dies wird u.a. als eine mögliche Erklärung der Wachstums-hemmenden Effekte der mTOR-Hemmer in hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen, einschließlich glatter Gefäßmuskelzellen, diskutiert (*Sehgal, 1995*).

Aufgrund der Tatsache, dass sowohl Calcineurin- als auch mTOR-Hemmer zu einer Erhöhung der Myosin-Ratio führen, ist es fraglich, ob die Calcineurin-Hemmung der entscheidende Faktor für die beschriebene Veränderung der Myosin-Ratio ist.

### 6.2.5 Einfluss der Immunsuppressiva auf die Nierenfunktion

Neben der Hypertonie ist die Nephrotoxizität die wichtigste Nebenwirkung der Calcineurin-Inhibitoren. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch nur teilweise geklärt.

Die unter CsA-Gabe erstmals 1978 beobachtete Nephrotoxizität (*Calne et al., 1978*) wurde bislang am intensivsten untersucht. Es ist hierbei zu unterscheiden zwischen einer funktionellen, akuten CsA-Toxizität mit ausgeprägten hämodynamischen Effekten, und einer morphologischen, vorwiegend chronischen Nephrotoxizität mit histologisch sichtbaren Veränderungen, überwiegend an Gefäßen, aber auch an Tubuli und Interstitium (*Bennet et al., 1996; Mihatsch et al., 1988b*). Die funktionelle Nephrotoxizität ist dosisunabhängig und reversibel. Sie besteht in einer Vasokonstriktion der afferenten präglomerulären Arteriole mit Erhöhung des renalen Gefäßwiderstands und einem Abfall des renalen Plasmaflusses und des Glomerulusfiltrats ohne wesentlichen tubulären Funktionsverlust (*English et al., 1987*). Die morphologisch sichtbare Nephrotoxizität tritt meist ebenfalls relativ früh nach CsA-Gabe auf, ist reversibel, und wurde in ischämiegeschädigten Organen und bei hohen CsA-Spiegeln häufiger beobachtet. Sie hat jedoch kaum klinische Auswirkungen (*Mihatsch et al., 1988a*). Typisch sind dabei mit fokaler Verteilung im proximalen Tubulus zu beobachtende Veränderungen wie Riesenmitochondrien, isometrische Vakuolisierung und Mikrokalzifikationen.

Die morphologisch sichtbare Arteriopathie ist hingegen das Hauptkennzeichen der eigentlichen Cyclosporin-Nephropathie. Es handelt sich hierbei um eine vaskulo-interstitielle Läsion mit Tubulusatrophie, die erstmals von *Mihatsch et al. (1983, 1988b)* beschrieben wurde. In der Frühphase kommt es u.a. zur Vakuolisierung von Endothelzellen und glatten Muskelzellen, gefolgt von Medianekrose mit Proteinablagerungen. Später kommt es dann zum glomerulären Kollaps und zur Atrophie des ungespeisten Tubulus unter Entwicklung der charakteristischen, streifenartigen Fibrose (*Thomas et al., 1998*).

Diese morphologisch sichtbare CsA-Nephropathie ist nur beim Menschen zu beobachten, und dies häufiger bei extrarenalen Transplantationen von Herz, Leber, Pankreas, Knochenmark und

bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen mit Cyclosporin, als nach Nierentransplantationen ( *Feutren et al., 1992; Lewis, 1995; Bennett et al., 1996; Remuzzi et al., 1995*). Daher schien es sinnvoll, die durch Immunsuppressiva-induzierten Veränderungen der Nieren an gesunden Ratten zu untersuchen.

Eine Reihe von Studien, insbesondere an Leber-transplantierten Patienten hat gezeigt, dass Tacrolimus eine ähnliche Nephrotoxizität wie CsA besitzt ( *Chrysostomou et al., 1993*).

Es konnte in diesem Zusammenhang bei Hunden, Ratten und Mäusen gezeigt werden, dass sich die durch CsA und FK506 verursachte Verschlechterung der Nierenfunktion parallel zu der Calcineurin-abhängigen Immunsuppression verhält. ( *Sander et al., 1996*).

Die Tatsache, dass das Calcineurin-Protein in den Nieren stark exprimiert wird, ist bekannt. Es konnte lokalisiert werden im proximalen Tubulus, und in 10-fach geringerer Menge auch in den kortikalen Sammelrohren und in den dicken aufsteigenden Ästen der Medulla ( *Tumlin, 1997*). In der Niere spielt die Phosphorylierung von Proteinen eine zentrale Rolle für viele, am  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Transport beteiligte Signalwege. So wird über Calcineurin-kontrollierte Signaltransduktionswege die basale und stimulierte  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase Aktivität des proximalen und distalen Tubulus beeinflusst. Auch adrenerge, dopaminerge und angiotensinogene ( $\text{AT}_1$ ) Rezeptoren regulieren über Calcineurin-abhängige Prozesse die Aktivität der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase. Daneben scheinen Steroidhormone, wie Glucocorticoide und Mineralocorticoide, aktivierend auf die Calcineurin-Phosphatase-Aktivität zu wirken ( *Tumlin, 1997*).

Dass aus der Hemmung dieser in großen Mengen vorhandenen Proteinphosphatase diverse Störungen der Nierenfunktion resultieren, ist eine logische Schlussfolgerung. Die Calcineurin-Inhibitoren CsA und FK506 hemmen z.B. die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase im distalen Tubulus (die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase im proximalen Tubulus wird durch CsA und FK506 nicht beeinflusst, da dort sehr viel höhere Calcineurin-Konzentrationen vorliegen). Rapamycin hingegen hemmt die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase nicht, da es nicht mit Calcineurin interferiert ( *Lea et al., 1994*).

Somit erschien es sinnvoll, die renalen Wirkungen von Calcineurin-Inhibitoren mit der Wirkung des mTOR-Inhibitors SDZ-RAD im Tierversuch zu vergleichen.

### 6.2.5.1 Nierenfunktion unter SDZ-RAD

Zu nierenspezifischen Veränderungen unter SDZ-RAD ist in der zur Verfügung stehenden Literatur nichts beschrieben. Es ist jedoch bekannt, dass dem mTOR-Hemmer Rapamycin vasomotorische renale Nebenwirkungen, wie sie bei Calcineurin-Inhibitoren typisch sind, fehlen. Glomeruläre Filtrationsrate und renaler Blutfluss sind unter Rapamycin sowohl bei normalen ( *Di Joseph et al., 1992*) als auch bei Salz-deplierten ( *Andoh et al., 1996a*) und spontan-hypertensiven ( *Di Joseph et al., 1994*) Ratten unverändert.

Erstaunlicher Weise zeigten die Tiere der SDZ-Gruppe jedoch als einzige Verumgruppe neben einem verringerten Wasserverbrauch auch einen erhöhten Hämatokrit und ein deutlich erhöhtes Plasmakreatinin.

*Andoh et al. (1996b)* haben in diesem Zusammenhang aufgezeigt, dass Rapamycin an der Ratte eine dosis-abhängige tubuläre Toxizität verursacht, welche anscheinend durch eine verzögerte Regeneration der tubulären Epithelfunktion verursacht wird. Berichte über eine gestörte Nierenfunktion bei mit SDZ-RAD behandelten Ratten liegen derzeit nicht vor.

### 6.2.5.2 Die Aktivität des sympathischen Nervensystems der Niere

Über eine Aktivierung sympathischer Nerven der Ratte nach akuter Gabe von CsA und FK506 wurde erstmals 1993 von *Lyson et al.* berichtet. Diese Arbeitsgruppe gab schließlich auch den ersten Hinweis darauf, dass Calcineurin ein wichtiges zelluläres Ziel für die Vermittlung der CsA- und FK506-induzierten Sympathikus-Aktivierung ist. Eine gesteigerte Aktivität renaler Nerven konnte nur unter Calcineurin-Inhibitoren, nicht jedoch unter Rapamycin festgestellt werden (*Lyson et al., 1993, 1994*). Gezielte Struktur-Funktionsstudien mit CsA- und FK506-Analogen, deren Calcineurin-Bindungsstellen geringfügig verändert waren bestätigten diese Ergebnisse (*Liu et al., 1992*).

Übereinstimmend konnte auch im Rahmen der Dissertation gezeigt werden, dass die beiden Calcineurin-Inhibitoren CsA und FK506 die Noradrenalin-Konzentrationen im Nierencortex signifikant erhöhen. Der mTOR-Hemmer SDZ-RAD hatte keinen derartigen Effekt.

In diesem Zusammenhang ist die Tatsache wichtig, dass CsA und FK506 in der Niere die Bildung des multifunktionellen Cytokins TGF- $\beta$  steigern (*Border et al., 1994; Khanna et al., 1999a, 1999b*). Das immunsuppressive TGF- $\beta$  bewirkt einerseits eine verstärkte Ablagerung extrazellulärer Matrix durch Hemmung des Matrixabbaus (Protease-Synthese sinkt, Stimulation von Protease-Inhibitoren) und erzeugt so die unter beiden Immunsuppressiva zu beobachtende Fibrose der Niere (fibrogene Wirkung). Andererseits steigert dieser Faktor - neben der renalen Bildung von Endothelin-1 - auch die sympathische Aktivität der Niere (*Shibab et al., 1996*).

Über eine erhöhte sympathische Aktivität der Nieren unter Rapamycin bzw. SDZ-RAD ist bislang nicht berichtet worden. Hingegen wurde von *Khanna (2000)* in einem Zellkulturmodell mit Lymphocyten aufgezeigt, dass es bei Kombination jeweils subklinischer Dosierungen von Rapamycin mit CsA oder FK506 zu einer stärkeren Induktion von TGF- $\beta$  kommt, als bei Applikation der einzelnen Substanzen. Die TGF- $\beta$ -Spiegel sind dabei direkt proportional, die IL-2 Spiegel indirekt proportional zu der Hemmung der Lymphocyten-Proliferation. *Khanna et al.* folgern hieraus, dass TGF- $\beta$  ein grundlegender und gemeinsamer Mediator der immunsuppressiven Effekte aller 3 Arzneistoffe ist, und dass die Kombination subklinischer Konzentrationen für eine optimale Immunsuppression genügt (*Khanna, 2000*).

### 6.2.5.3 Expression der COX-1 und COX-2 in den Nieren

Lange Zeit galt die Cyclooxygenase 2 als ein in erster Linie induzierbares Enzym, welchem man z.B. bei Entzündungsprozessen eine Hauptrolle zusprach (*Smith et al., 2000*). Mittlerweile hat sich gezeigt, dass sie jedoch in einigen Organen, einschließlich der Niere, auch unter normalen Bedingungen exprimiert wird (*Harris et al., 1994*). In der Niere konnte eine signifikante Expression von COX-2 in den Glomeruli, in den dicken aufsteigenden Ästen der Henleschen Schleife (TALH) einschließlich der Macula densa Region und in den medullären interstitiellen Zellen nachgewiesen werden (*Harris et al., 1994; Vio et al., 1997*).

Die molekularen Signalmechanismen, welche für die COX-2 Expression in den TALH-Zellen und den interstitiellen Zellen der Macula densa verantwortlich sind, sind jedoch nur schlecht geklärt. Es wurden bereits erste Beweise für eine mögliche Beteiligung des MAP-Kinase- und des NF- $\kappa$ B-Mechanismus angeführt (*Hao et al., 2000; Cheng et al., 2000; Yang et al., 2000*).

Während es bereits seit längerer Zeit bekannt ist, dass der Cyclooxygenase 2 Genpromotor neben einer klassischen TATA-Box, einer E-Box und einem CRE-Element auch Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- $\kappa$ B, enthält (*Inoue et al., 1995; Morris et al., 1996; Xie et*

*al.*, 1994; Yamamoto *et al.*, 1995), wurde erst vor relativ kurzer Zeit entdeckt, dass er auch funktionelle Bindungsstellen für den Nukleären Faktor von aktivierten T-Zellen (NFAT) enthält (Hernandez *et al.*, 2001; De Gregorio *et al.*, 2001; Iniguez *et al.*, 2000; Sugimoto *et al.*, 2001). In mehreren Zell-Linien konnte bei Aktivierung von NFAT eine Stimulation der COX-2 nachgewiesen werden (Iniguez *et al.*, 2000).

Da die, für die Aktivierung von NFAT nötige, Proteinphosphatase Calcineurin durch Immunsuppressiva wie Cyclosporin A und Tacrolimus gehemmt wird (Crabtree *et al.*, 1999), erschien es denkbar, dass diese Wirkstoffe in vivo mit der regulierten COX-2 Expression, ganz besonders auch der renalen COX-2 Expression, interferieren könnten. Aufgrund der nephrotoxischen Nebenwirkung beider Immunsuppressiva lag außerdem die Vermutung nahe, dass diese Interferenz möglicherweise eine Ursache der charakteristischen Veränderungen in den Nieren ist.

In Anbetracht einer potentiellen Rolle der Cyclooxygenase 2 für die normale Nierenfunktion (Harris, 2000; Harris *et al.*, 2001) wurde deshalb die Wirkung der Immunsuppressiva auf die renale COX-2 Expression untersucht.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

Die basale COX-1 Gen- und Proteinexpression wurde weder durch Calcineurin-Inhibitoren, noch durch SDZ-RAD beeinflusst. Hingegen kam es unter Cyclosporin A und Tacrolimus zu einer signifikanten Verringerung der basalen COX-2 Genexpression in allen Nierenzonen. Diese Veränderung wurde begleitet von einer Reduktion der COX-2 Proteinspiegel in der Nierenrinde der mit CsA und FK506 behandelten Tiere. Für Cyclosporin A wurde zusätzlich auch die Proteinexpression der inneren und äußeren Medulla untersucht. Auch hier konnte stets eine signifikant erniedrigte COX-2 Proteinexpression nachgewiesen werden. Durch immunhistochemische Färbungen der COX-2 wurden die Ergebnisse der Gen- und Proteinexpression zusätzlich bestätigt. Es war sowohl in den TALH/Macula densa Zellen, als auch in den interstitiellen Zellen der Medulla eine verringerte COX-2 Immunoreaktivität festzustellen. Im Gegensatz hierzu konnte nachgewiesen werden, dass der mTOR-Hemmer SDZ-RAD keinen Einfluss auf die basale Expression der COX-2 hat.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Calcineurin-Inhibitoren FK506 und CsA - im Gegensatz zu dem mTOR-Hemmer SDZ-RAD - die regulierte Expression der COX-2 merkbar abschwächen. Beide sind gut charakterisierte Inhibitoren der Phosphatase Calcineurin und somit auch des NFAT-Signalmechanismus. Es kann aus den Ergebnissen gefolgert werden, dass der NFAT-Mechanismus eine entscheidende Determinante für die regulierte COX-2 Expression der Niere ist.

Bisher wurde der NFAT-Mechanismus hauptsächlich in Zusammenhang gebracht mit einer selektiven Induktion der COX-2 Expression - nicht jedoch der COX-1 Expression - durch T-Zell-Rezeptor-Aktivierung (Iniguez *et al.*, 2000), durch Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF (Hernandez *et al.*, 2001) oder durch Endothelin (Yamamoto *et al.*, 1995). Im Rahmen der Dissertation konnte nun gezeigt werden, dass bereits in vivo die basale Expression der Cyclooxygenase 2 in den tubulären Zellen der Macula densa und in den medullären interstitiellen Zellen vom NFAT-Mechanismus abhängig ist.

Die Hemmung der COX-2 Expression muss daher wenigstens zum Teil für die wohlbekannten nierenspezifischen Nebenwirkungen der Calcineurin-Inhibitoren verantwortlich sein. Dies wird noch wahrscheinlicher, wenn man berücksichtigt, dass Calcineurin-Inhibitoren und selektive COX-2 Hemmer gleichartige Effekte auf die Nierenfunktion haben. So verursachen beide

Klassen eine Vasokonstriktion der afferenten Arteriole, eine Reduktion der GFR und eine Kalium- und Natrium-Retention (Myers *et al.*, 1984; Olyaei *et al.*, 1999; Komers *et al.*, 2001; Ichihara *et al.*, 1999; Rossat *et al.*, 1999).

Ebenso wichtig sind in diesem Zusammenhang neuere Erkenntnisse zur Bedeutung der COX-2 Isoform für fibrotische Organveränderungen. Untersuchungen an COX-2 Knock-out Mäusen haben gezeigt, dass es bei diesen Tieren in den Nieren, und auch in anderen Organen, wie dem Herzen und den Ovarien, zu fibrotischen Abnormalitäten kommt (Morham *et al.*, 1995; Dinchuk *et al.*, 1995). Somit wäre es denkbar, dass für die Entstehung der gestreiften Fibrose, neben der gesteigerten Expression von TGF- $\beta$ , auch die verringerte Gen- und Proteinexpression der COX-2 von Bedeutung ist (siehe auch 6.2.5.4).

#### 6.2.5.4 Prostaglandin E<sub>2</sub> in den Nieren

Mehrere Autoren haben die Nephrotoxizität der Calcineurin-Inhibitoren mit einer reduzierten Freisetzung der vasodilatierenden Prostaglandine E<sub>2</sub> und I<sub>2</sub> assoziiert (Darlametsos *et al.*, 2000a, 2000b; Bunchman *et al.*, 1991; Bennett *et al.*, 1988). Die Folge ist ein Ungleichgewicht zwischen vasodilatierenden Prostaglandinen und dem vasokonstriktorischem Thromboxan A<sub>2</sub>. Diese Störung wird als eine der Ursachen für die bei Calcineurin-Hemmung charakteristische Vasokonstriktion der afferenten Arteriole angesehen (Butterly *et al.*, 2000). Die fortbestehende Vasokonstriktion wird als möglicher pathogener Faktor für die Entstehung der tubulären Nekrose und der tubulo-interstitiellen Läsionen diskutiert (Bennett *et al.*, 1996).

Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte aufgezeigt werden, dass die verringerte COX-2 Expression bei Calcineurin-Hemmung von einer deutlichen Reduktion der PGE<sub>2</sub>-Spiegel in der Nierenrinde begleitet wird. Stellvertretend für Calcineurin-Inhibitoren zeigte sich dies unter CsA-Medikation auch in den anderen Nierenzonen.

Zu Untersuchungen an der Ratte finden sich in der Literatur jedoch auch widersprüchliche Daten. Vereinzelte Berichte plädieren z.B. dafür, dass die CsA-Nephrotoxizität zumindest teilweise von Veränderungen in der Prostanoid-Synthese unabhängig ist. Als mögliche Ursache hierfür werden aber in erster Linie Unterschiede zwischen den verwendeten Rattenstämmen verantwortlich gemacht (Darlametsos *et al.*, 2001; Schnabel *et al.*, 1990; Youngleman *et al.*, 1991).

Da ein potenter inhibitorischer Effekt von PGE<sub>2</sub> auf die Fibroblastenproliferation (Mc Anulty *et al.*, 1997) und die Kollagenproduktion (Saltzman *et al.*, 1982) nachgewiesen ist, könnte die reduzierte PGE<sub>2</sub>-Bildung in der Niere auch von Relevanz für die Entwicklung der bei Calcineurin-Hemmung zu beobachtenden gestreiften Fibrose sein. Die PGE<sub>2</sub>-Bildung der Fibroblasten wird durch TGF- $\beta$  stimuliert (Mc Anulty *et al.*, 1997). Somit hat TGF- $\beta$  neben der proliferativen Wirkung auch eine indirekte, anti-proliferative Wirkung auf Fibroblasten. In Experimenten mit dem selektiven COX-2 Inhibitor NS-398 konnte gezeigt werden, dass dieser die TGF- $\beta$ -stimulierte PGE<sub>2</sub>-Synthese von intakten Lungenfibroblasten hemmt. Die COX-2, auf deren Genpromotor ein TGF- $\beta$  Response Element lokalisiert werden konnte (Yang *et al.*, 1997), scheint somit die relevante Isoform, für die durch TGF- $\beta$ -stimulierte PGE<sub>2</sub>-Synthese der Fibroblasten, zu sein (Keerthisingam *et al.*, 2001). In intakten Fibroblasten gesunder Lungen konnte eine Stimulation der COX-2 Genexpression durch TGF- $\beta$  nachgewiesen werden. In Fibroblasten von fibrotisch veränderten Lungengewebe wurde jedoch die TGF- $\beta$ -stimulierte PGE<sub>2</sub>-Synthese durch eine Hemmung der Up-Regulation der COX-2 mRNA Spiegel unterbunden (Keerthisingam *et al.*, 2001). Als Ursache wird ein pre-translatiionaler Defekt (u.a. verringerte mRNA-Stabilität und Promotor-assoziierte Veränderungen in den regulatorischen Regionen des COX-2 Promotors) vermutet (Keerthisingam *et al.*, 2001).



Die Ergebnisse der Dissertation deuten darauf hin, dass bei der durch Calcineurin-Hemmer induzierten Nephrotoxizität und Fibrose gleichartige Veränderungen zugrunde liegen könnten.

#### 6.2.5.5 Einfluss der Immunsuppressiva auf das Renin-Angiotensin-System

Eine mögliche Hauptfunktion der COX-2 in der Macula densa soll die Kontrolle der Renin-Sekretion und Renin-Synthese in den benachbarten juxtaglomerulären Zellen anhand der PGE<sub>2</sub>- und möglicherweise auch der PGI<sub>2</sub>-Bildung sein (*Cheng et al., 1999*). Beide sind direkte Stimulatoren auf der Ebene der juxtaglomerulären Zellen (*Jensen et al., 1996*). Es war somit naheliegend, zu untersuchen, ob die durch Calcineurin-Hemmung verursachte Modulation der COX-2 der Macula densa Veränderungen der Renin-Sekretion und Renin-Genexpression induziert.

Es konnte gezeigt werden, dass Cyclosporin A und Tacrolimus unter basalen Bedingungen eine Steigerung der Renin-Genexpression, der Plasmarenin-Aktivität (PRA) und der Plasmaaldosteron-Konzentration bewirken.

Es wurde in diesem Zusammenhang anhand von in vitro Studien nahegelegt, dass CsA einen direkten Einfluss auf die Freisetzung von Renin im Nierencortex hat (*Baxter et al., 1984; Lustig et al., 1984*). *Kurtz et al. (1988)* konnten unter Verwendung von juxtaglomerulären Zellen zeigen, dass CsA nicht nur die Renin-Sekretion, sondern auch die Renin-Synthese stimuliert. Unter Tacrolimus wurden gesteigerte Renin mRNA Spiegel im Nierencortex der Ratte nachgewiesen (*Nakatani et al., 2001*). Ebenso konnte eine gesteigerte Plasmarenin-Aktivität unter CsA und FK506 bereits in vielen Versuchen mit Ratten gezeigt werden (*Mason et al., 1991; Siegl et al., 1982; Lustig et al., 1987; Nakatani et al., 2001*).

Es ist anzumerken, dass, obwohl die meisten Wirkungen von Calcineurin-Inhibitoren bei Mensch und Tier sehr ähnlich sind, die Plasmarenin-Aktivität beim Menschen unter CsA und FK506 nicht erhöht, sondern i.d.R. normal oder erniedrigt ist (*Lee, 1997; Mason et al., 1991*). Dies wird damit erklärt, dass Calcineurininhibitoren sowohl das zirkulierende RAS als auch die lokalen Renin-Angiotensin-Systeme stimulieren. Die bei Tieren erhöhte PRA soll die frühe Phase der Stimulation des zirkulierenden RAS repräsentieren. Die erniedrigten Spiegel in Humanstudien sollen hingegen auf der chronischen Stimulation der Gewebe-RAS in Niere, Leber, Nebennieren und in den Gefäßen basieren (*Lee, 1997*).

Die nachgewiesene Aktivierung des zirkulierenden RAS (PRA) und lokalen RAS der Niere (Renin mRNA) kann wesentlich zur beobachteten Blutdrucksteigerung beitragen. Dafür sprechen auch Versuche an SHR, in denen eine Protektion der kardiovaskulären Toxizität von Cyclosporin A durch Enalapril und Valsartan nachgewiesen wurde (*Lassila et al., 2000*). Zudem hat sich in der Behandlung der posttransplantationären Hypertonie die Verwendung von ACE-Hemmern besonders bewährt (*Textor et al., 2000*).

Anhand der renalen Effekte der Calcineurin-Inhibitoren können auch einige zusätzliche Informationen über eine mögliche Interferenz zwischen der Regulation der COX-2 in der Macula densa und der Sekretion und Synthese von Renin im juxtaglomerulären Apparat gewonnen werden.

Basierend auf Experimenten mit selektiven COX-2 Blockern (*Cheng et al., 1999; Harding et al., 2000; Traynor et al., 1999*) und COX-2 Knock-out Mäusen (*Cheng et al., 2001; Yang et al., 2000*) wurde die Hypothese entwickelt, dass die COX-2 Aktivität in der Macula densa die

Synthese und Sekretion von Renin ganz essentiell fördert und reguliert (*Harris, 2000; Harris et al., 2001*). Widersprüchliche Berichte lassen hieran jedoch zunehmend mehr Zweifel entstehen. Es ist eine Tatsache, dass herkömmlich verfügbare COX-2 Blocker nicht durchwegs die Kontrolle der Reninsynthese und -sekretion beeinflussen (*Mann et al., 2001; Rossat et al., 1999; Rodriguez et al., 2000; Höcherl et al., 2001*). Diese im Rahmen der Dissertation gewonnenen, neuen Ergebnisse bestätigen die letzteren Befunde, denn sie zeigen, dass die Hemmung der COX-2 in der Macula densa die basale Renin-Synthese und Renin-Sekretion nicht abschwächt.

Für den mTOR-Hemmer SDZ-RAD zeigte sich eine signifikante Reduktion der Renin-Genexpression, bei ebenfalls erhöhter Plasmarenin-Aktivität und Plasmaaldosteron-Konzentration.

Es wird diesbezüglich für den mTOR-Hemmer Rapamycin ein protektiver Effekt auf die Nieren diskutiert, der aus der Hemmung der intrarenalen Angiotensin II Kaskade resultieren soll (*Podder et al., 2001*). Im Gegensatz hierzu wird die durch Calcineurin-Hemmung verursachte Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems mit einer gesteigerten Expression von TGF- $\beta$  assoziiert, und als wichtige Ursache der streifenartigen Fibrose angesehen (*Ader et al., 1998*).

#### **6.2.5.6 Gen- und Proteinexpression der endothelialen und neuronalen NO-Synthase bei Immunsuppression**

Die NO-Synthase ist in vitro ein Substrat der Phosphatase Calcineurin (*Dawson et al., 1993*). Zur Frage, ob Calcineurin-Hemmung die Aktivität der NO-Synthase in vitro verringert (*Dawson et al., 1993; Fast et al., 1993; Mittal et al., 1994; Zhang et al., 1995*), steigert (*Busse et al., 1991; Forstermann et al., 1991*) oder nicht beeinflusst (*Marumo et al., 1995*) liegen widersprüchliche Aussagen vor. Die physiologische Bedeutung in vivo ist ebenfalls noch unklar (*Sander et al., 1996*).

Für die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und FK506 konnte nachgewiesen werden, dass sie die stimulierte NO-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte hemmen (*Akita et al., 1994*). Die Wirkung ist bei Tacrolimus weniger stark ausgeprägt als bei Cyclosporin A. Bei der 2-wöchigen Behandlung von Ratten mit CsA (15mg/kg/Tag), FK506 und Rapamycin konnte bei CsA und FK506 eine signifikante Verringerung der  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ -Urin-Spiegel festgestellt werden. Unter Rapamycin kam es hingegen zu keiner Veränderung (*Andoh et al., 1996a*). Hingegen konnte von anderen Autoren auch unveränderte  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ -Urin-Spiegel festgestellt werden, wenn Ratten höhere Dosierungen von CsA (30mg/kg/Tag) über 4 Wochen verabreicht wurden (*Assis et al., 1997*). Andererseits wurden von *Bobadilla et al. (1998)* unter CsA gesteigerte eNOS mRNA Spiegel in der Nierenrinde von Ratten gezeigt.

Die Behandlung mit L-Arginin bewirkt eine deutliche Steigerung der NO-Biosynthese und schützt die Ratten gegen eine CsA-induzierte Verringerung der GFR und gegen die - für CsA-Behandlung typische - Fibrose (*Andoh et al., 1997; Assis et al., 1997*).

Diese zum Teil widersprüchlich erscheinenden Daten legen dennoch nahe, dass NO durchaus eine Rolle für die chronische Nephropathie der Calcineurin-Inhibitoren spielen könnte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten jedoch weder bei der endothelialen, noch bei der neuronalen NO-Synthase des Nierencortex signifikante Veränderungen unter Calcineurin- und mTOR-Hemmung festgestellt werden.

### **6.3 Diskussion der Ergebnisse zum Einfluss von Cyclosporin A auf die Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems und der renalen COX-2- und nNOS-Isoenzyme**

#### **6.3.1 Die Stimulation der Cyclooxygenase 2 der Nieren**

In den Nieren wird die Cyclooxygenase 2 in den Glomeruli, in den dicken aufsteigenden Ästen der Henleschen Schleife (TALH), einschließlich der Macula densa Region, und in den medullären interstitiellen Zellen exprimiert (*Harris et al., 1994; Vio et al., 1997*). Im zweiten Teil der vorliegenden Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus eine selektive Hemmung der renalen COX-2 Gen- und Proteinexpression verursachen, ohne dabei die basale Reninsekretion und -synthese zu verringern.

Es ist allgemein bekannt, dass die basale Expression der COX-2 im dicken aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife (TALH), und hier v.a. in den Macula densa-Strukturen, z.B. durch Verringerung der Salzzufuhr, Furosemid-Behandlung oder eine Verminderung des renalen Perfusionsdruckes stimuliert werden kann (*Vio et al., 1997; Hartner et al., 1998; Wang et al., 1999*). Dabei kommt es, parallel zur Stimulation der COX-2 Expression in der Macula densa Region, auch zu einer Stimulation der Renin-Synthese und -Sekretion und damit zu einer erhöhten Bildung von Angiotensin II (*Harding et al., 1997; Schricker et al., 1995a, 1995b*).

Es wurde daher im dritten Teil der vorliegenden Arbeit über einen Zeitraum von 7 Tagen die Wirkung von Salzmenge mit oder ohne zusätzliche Ramipril-induzierte ACE-Hemmung bei mit Cyclosporin A (15mg/kg/Tag) behandelten, ca. 6 Wochen alten, WKY-Ratten untersucht.

#### **6.3.2 Veränderung physiologischer Parameter unter Nidrigsalz bzw. der Kombination von Nidrigsalz und Ramipril**

Die Ausscheidung von Salz und Wasser durch die Nieren wird vor allem durch die glomeruläre Filtrationsrate, die Reabsorptionsprozesse des Nephrons und die Durchblutung des Nierenmarks bestimmt. Die Macula densa Zellen detektieren die Kochsalzmenge im Glomerulusfiltrat. Bei einer niedrigen Salzkonzentration kommt es zu einer schnellen Dilatation der afferenten Arteriole. Daraus resultiert eine gesteigerte glomeruläre Filtration, und die Stimulation der Synthese und Sekretion von Renin, die mit einer vermehrten Angiotensin-II Bildung verbunden ist.

Bei alleiniger Behandlung von Ratten mit Nidrigsalz konnte verglichen mit Normalsalz sowohl ein reduzierter Wasserverbrauch als auch ein geringeres Nierengewicht festgestellt werden.

Die Wirkung eines durch Nidrigsalz stimulierten Renin-Angiotensin-Systems kann durch gleichzeitige Inhibition des Angiotensin I Conversionsenzyms (ACE) mit Ramipril (10mg/kg/Tag) gehemmt werden.

Die aus der Kombination von Ramipril und salzarmer Diät resultierenden Veränderungen sind vielfältig. Es kommt u.a. zur Stimulation des renalen Barorezeptors, zu Veränderungen im renalen Blutfluss und in der GFR, sowie zu einer Unterbrechung des Angiotensin-vermittelten negativen Feedback-Mechanismus für Renin (*Höcherl et al., 2002*). In diesem Zusammenhang konnte auch eine deutliche Abnahme des renalen Gefäßwiderstandes nachgewiesen werden (*Castrop et al., 2001*).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei Kombination von Ramipril mit Nidrigsalz folgende, sowohl gegenüber Normalsalz als auch gegenüber Nidrigsalz signifikante Veränderungen festgestellt: eine deutliche Verringerung des Futterbedarfs, daraus resultierender Gewichtsverlust und deutlich erhöhte Plasmakreatinin- und Hämatokrit-Werte.

### 6.3.3 Calcineurin-Hemmung und verringerte Salzzufuhr

Obwohl die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus chemisch wenig verwandt sind, erzeugen sie in der Niere die gleiche Art der Zellschädigung. In Rattenmodellen lässt sich dosisabhängig sowohl für Tacrolimus (*Andoh et al., 1996a; Shihab et al., 1997; Kumano et al., 1991*) als auch für Cyclosporin A (*Elzinga et al., 2000*) eine funktionelle und morphologische Nephrotoxizität erzeugen. In beiden Fällen kommt es dabei zu einer gesteigerten Expression von TGF- $\beta$  und Matrixproteinen, welche in der charakteristischen, gestreiften Fibrose resultieren. Der letztlich ultimative molekulare Mechanismus dieser Schädigung muss daher ähnlich sein (*Liu et al., 1991; Randhawa et al., 1993*).

*Elzinga et al. (1993)* konnten zeigen, dass es bei Ratten zu einer Potenzierung der Cyclosporin A-induzierten, strukturellen Veränderungen der Niere kommt, wenn die Salzaufnahme der Tiere verringert wird. Die resultierenden Schäden sind dabei am schwerwiegendsten im inneren Streifen der äußeren Medulla. Dies entspricht der Lokalisation des medullären, dicken aufsteigenden Astes der Henleschen Schleife. Das verwendete Modell dient jedoch in erster Linie zur Nachahmung der chronischen CsA-Nephrotoxizität (*Elzinga et al., 1993*). Auch bei chronischer Tacrolimus-Behandlung von Ratten unter Nidrigsalz konnte eine Verringerung der Nierenfunktion nachgewiesen werden (*Andoh et al., 1996a, Sitllman et al., 1995*).

Dass die im Rahmen der Dissertation bei Nidrigsalz zu beobachtende Reduktion des Nierengewichts nicht auch in der Nidrigsalz-CsA-Gruppe auftrat, war verwunderlich. Trotz des gegenüber Nidrigsalz stark reduzierten Wasserverbrauchs der Nidrigsalz-CsA-Gruppe, entsprachen die Hämatokrit- und Plasmakreatinin-Werte der Normalsalz- und Nidrigsalz-Kontrolle.

Charakteristisch für Cyclosporin A war, dass es, unabhängig von der Salzkonzentration der Nahrung, bei jeder Gruppe eine deutliche Abnahme des Wasserbedarfs (und des Körpergewichts) bewirkte.

### 6.3.4 Blutdruck und Herzfrequenz

Während Nidrigsalz allein zu keiner signifikanten Veränderung des Blutdrucks führte, kam es bei zusätzlicher Ramipril-Gabe zu einer deutlichen Abnahme des systolischen Blutdrucks. Der durch CsA verursachte Blutdruckanstieg bei Normal- und Nidrigsalz, konnte in der Nidrigsalz-Ramipril-Gruppe verhindert werden. Beim Menschen wird die Wirksamkeit von ACE-Hemmern erfolgreich für die Langzeit-Behandlung der durch Calcineurin-Inhibitoren verursachten Hypertonie genutzt (*Textor et al., 2000*).

Bei der Untersuchung der Herzfrequenz zeigte sich, dass Salzangel mit ACE-Blockade zu einer stärkeren Steigerung der Frequenz führt als Salzangel alleine. Durch CsA wurde die Herzfrequenz in jeder Gruppe nochmals erhöht. Das sympathische Nervensystem scheint somit, verglichen mit Normalsalz, in allen Fällen aktiviert zu sein.

### 6.3.5 Die renokortikalen Katecholamin-Spiegel

Die Renin-produzierenden, juxtaglomerulären Zellen und die Macula densa Zellen sind mit  $\beta$ -Adrenozeptoren ausgestattet. Volumenverringerung und/oder die Abnahme des Blutdrucks während Salz- oder Natriummangel aktivieren das sympathische System (*Di Bona et al., 1985, 1997; Holmer et al., 1993; Wagner et al., 1997; 1999*).

Bei der Untersuchung des Nierencortex zeigte sich, dass die einwöchige Behandlung mit Natriumsalz oder Natriumsalz in Kombination mit Ramipril keine Veränderung der Katecholamine verursacht. Dies entspricht Ergebnissen von *Höcherl et al. (2000)*.

Bei Ratten bewirkt die gesteigerte Stimulation adrenerger Nerven bevorzugt eine Erhöhung des afferenten arteriolen Tonus. Durch die bevorzugte Vasokonstriktion afferenter Arteriolen reduziert sich der glomeruläre Kapillardruck (*Kon et al., 1983*). In den Glomeruli von nur mit CsA behandelten Ratten konnte anhand von Elektronenmikroskopie ebenfalls eine bevorzugte Vasokonstriktion der afferenten Arteriolen festgestellt werden (*English et al., 1987*).

In dieser Arbeit führte die Gabe von Cyclosporin A bei Natriumsalz zu einer gesteigerten Noradrenalin-Konzentration der Nierenrinde. Die anderen Katecholamin-Spiegel entsprachen stets den Spiegeln der jeweiligen Kontrolle.

### 6.3.6 Cyclooxygenasen und Prostaglandine in der Nierenrinde

Während die renokortikale COX-1 Expression durch keine Behandlungsmaßnahme verändert wurde, stiegen die COX-2 mRNA-Spiegel unter Natriumsalz um das 2-fache, und unter zusätzlicher ACE-Blockade um das 7-fache. Dies konnte bereits früher gezeigt werden (*Wolf et al., 1999; Höcherl et al., 2002*).

Hingegen wurde die COX-2 Expression bei mit Cyclosporin A behandelten Tieren - unabhängig von der Art der Stimulation - bemerkenswert supprimiert. Auch die ebenfalls gesteigerte, renokortikale PGE<sub>2</sub>-Bildung wurde durch CsA-Behandlung deutlich abgeschwächt. Die immunhistochemische Färbung der Cyclooxygenase 2 in den TALH/Macula densa Strukturen bestätigte die Ergebnisse der COX-2 mRNA Genexpression. Es zeigte sich unter CsA-Behandlung stets eine signifikante Verringerung des prozentualen Anteils der COX-2-positiven Glomeruli. In Ergänzung spiegelte auch die Proteinexpression der Nierenrinde die Ergebnisse der Genexpression.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Calcineurin-Hemmer Cyclosporin A eine durch Salz- oder Natriummangel bzw. durch Salz- oder Natriummangel und ACE-Blockade induzierte Stimulation der renalen COX-2 Expression verhindert.

Wie unter basalen Bedingungen, so scheint auch die Stimulation der COX-2 bei Salz- oder Natriummangel den NFAT-Mechanismus zu involvieren.

Es wurde in diesem Zusammenhang von einigen Autoren bereits nahegelegt, dass der MAP-Kinase Mechanismus in die Hochregulierung der COX-2 Expression bei Salz- oder Natriummangel involviert ist (*Cheng et al., 2000; Yang et al., 2000*). Eine mögliche Erklärung für eine Kombination von MAP-Kinase- und NFAT-Weg könnte eine Beobachtung sein, die man bei T-Zellen gemacht hat: das Cot/p12-Protein, welches zu den MAP-Kinase-Kinasen gehört (*Flanagan et al., 1991; Salmeron et al., 1996; Fanger et al., 1997; Hunter, 1997; Patriotis et al., 1993; Miyoshi et al., 1991*), stimuliert die COX-2-Expression anhand des NFAT-Weges (*De Gregorio et al., 2001*).

Folglich wäre es denkbar, dass die Calcineurin-Inhibitoren auch die MAP-Kinase bezogene Stimulation der COX-2 Expression, zumindest in T-Zellen (*De Gregorio et al., 2001*), aber höchstwahrscheinlich auch in anderen Zellen, hemmen.

### 6.3.7 Renin-Synthese und Sekretion

In Übereinstimmung mit den Untersuchungen anderer Autoren (*Holmer et al., 1993; Höcherl et al., 2002; Castrop et al., 2001*) kam es sowohl bei Nidrigsalz, als auch bei der Kombination von Nidrigsalz mit Ramipril, zu einer deutlichen Zunahme der Renin-Genexpression des Nierencortex und der Plasmarenin-Aktivität.

Durch gleichzeitige Behandlung mit CsA wurde diese Zunahme eher noch verstärkt als abgeschwächt. Eine entsprechende Veränderung der Renin-Immunoreaktivität in den TALH/Macula densa-Strukturen bestätigte die Ergebnisse der Renin mRNA.

Es konnte somit gezeigt werden, dass Cyclosporin A nicht nur die basale sondern auch die stimulierte Renin-Synthese und -Sekretion steigert. Aufgrund der Tatsache, dass sich durch Cyclosporin A induzierte renale Veränderungen in der Ratte bei Salzangel besser erzeugen lassen, vermutete man bereits früher, dass das Renin-Angiotensin-System für die Nephrotoxizität eine Rolle spielt (*Stillman et al., 1995; Elzinga et al., 2000*). Diese Vermutung wird durch die vorliegenden Ergebnisse verstärkt.

Da die Hemmung der COX-2 Aktivität durch Calcineurin-Inhibitoren weder die basale, noch die stimulierte Renin-Sekretion und Renin-Genexpression schwächt, kann hieraus zusätzlich gefolgert werden, dass die Stimulation des Reninsystems durch Nidrigsalz und ACE-Inhibitoren im wesentlichen nicht durch die Aktivität der COX-2 der Macula densa vermittelt wird.

### 6.3.8 Endotheliale und neuronale NO-Synthase des Nierencortex

Während die eNOS des Nierencortex vom Endothel der afferenten Arteriole konstitutiv exprimiert wird, wird die Expression der nNOS in den Macula densa bei Salzangel, ACE-Blockade und Hypoperfusion parallel zur COX-2- und Renin-Expression reguliert (*Bosse et al., 1995; Schricker et al., 1996; Singh et al., 1996; Wolf et al., 1999; Yang et al., 1998; Cheng et al., 1999*).

Es konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass weder die Gen-, noch die Proteinexpression der renokortikalen eNOS durch Salzangel oder zusätzliche ACE-Blockade beeinflusst werden. Hingegen zeigte sich, in Abhängigkeit von der Art der Stimulation, eine moderate bis signifikante Zunahme der nNOS Gen- und Proteinexpression. Somit bestätigen sich auch hier die Ergebnisse von *Höcherl et al. (2002)*.

Die Behandlung mit Cyclosporin A hatte, wie schon bei der Untersuchung der basalen Expression, auch auf die stimulierte Expression der beiden NO-Synthase-Isoenzyme keinen Einfluss.

## 7 Zusammenfassung

### 7.1 Die Frühphase der primären Hypertonie

Im ersten Teil der Dissertation wurde die beginnende essentielle Hypertonie anhand des Modells der spontan hypertensiven Ratte untersucht. Als normotensive Kontrolle wurden Wistar-Kyoto-Ratten verwendet. Im Hinblick auf die besondere Bedeutung der Niere für die Auslösung und Aufrechterhaltung der primären Hypertonie wurde bei den 3 und 7 Wochen alten SH- und WKY-Ratten das Renin-Angiotensin-System, sowie die renale Gen- und Proteinexpression von Cyclooxygenase 1 und -2 und von endothelialer und neuronaler NO-Synthase untersucht. Ebenso wurde die Organverteilung dieser Isoenzyme bei 7 Wochen alten hypertensiven SHR und normotensiven WKY verglichen.

Bei den spontan hypertensiven Ratten begann der systolische Blutdruck ab der 4. Lebenswoche zu steigen. Bereits ab der 5. Lebenswoche konnte eine signifikante Erhöhung gegenüber gleichaltrigen WKY festgestellt werden. Die Herzfrequenz, welche sich bei beiden Stämmen zur 7. Lebenswoche hin verringerte, war bei SHR während der 4. und 5. Woche deutlich höher als bei WKY. Ebenso wurde nach 3-wöchiger Blutdruckerhöhung bei den 7 Wochen alten SHR ein erhöhtes relatives Herzgewicht und eine deutlich gesteigerte  $\beta$ -/ $\alpha$ -Myosin-Ratio nachgewiesen. Beides sind Anzeichen einer sich bei SHR entwickelnden Herzhypertrophie.

In den Nieren beider Rattenspezies zeigte sich eine altersabhängige Verringerung der Renin mRNA Genexpression. SH-Ratten hatten dabei zu jedem Zeitpunkt niedrigere Renin mRNA Spiegel als die normotensiven WKY-Ratten. Die Plasmaparenin-Aktivität war bei 7 Wochen alten hypertensiven SH-Ratten ebenfalls deutlich niedriger als bei gleich alten WKY. Bei den Plasmaaldosteron-Konzentrationen bestand hingegen zu keinem Zeitpunkt ein altersabhängiger oder stammspezifischer Unterschied.

Bei der Untersuchung der Organverteilung der Cyclooxygenase-Isoenzyme konnte die Gen- und Proteinexpression der COX-1 in allen untersuchten Organen nachgewiesen werden. Die Expression der COX-2 beschränkte sich stattdessen auf Gehirn, Niere und Lunge. Verglichen mit gleichaltrigen WKY waren dabei die COX-2 mRNA Spiegel in Nierenrinde und Gehirn von 7 Wochen alten SHR deutlich niedriger.

Mit zunehmendem Alter kam es bei beiden Stämmen nicht nur in der Nierenrinde zu einer selektiven und signifikanten Verringerung der COX-2 Genexpression, sondern auch in der äußeren Medulla. Auch die in der Nierenrinde untersuchten COX-2 Proteinspiegel waren bei beiden Stämmen im Alter erniedrigt. Im Gegensatz zu den COX-2 mRNA Spiegeln, die in der Nierenrinde 7 Wochen alter SHR signifikant niedriger waren, zeigte sich bei den COX-2 Proteinspiegeln kein Unterschied zwischen normotensiven und spontan hypertensiven Ratten. Die renokortikalen PGE<sub>2</sub>-Spiegel der beiden Rattenstämme entsprachen sich - im Gegensatz zur Gen- und Proteinexpression der COX-2 - zu jedem Zeitpunkt. Eine altersabhängige Veränderung wurde nicht beobachtet.

Bei der Untersuchung der Organverteilung der Calcium-Calmodulin-abhängigen NO-Synthasen zeigte sich, dass die mRNA der endothelialen Isoform in allen Organen exprimiert wird. Die nNOS mRNA war, mit Ausnahme der Leber, ebenso in allen Organen nachweisbar.

Verglichen mit 3 Wochen alten Tieren kam es mit zunehmendem Alter nur bei SHR zu einer Abnahme der e- und nNOS mRNA Expression in Nierenrinde und äußerer Medulla. Bei 7 Wochen alten SHR war daher die Genexpression beider NO-Synthasen in diesen Nierenzonen deutlich geringer als bei WKY.

Im Unterschied zu 7 Wochen alten WKY war außerdem die eNOS Genexpression im Herzen der SHR erniedrigt und die nNOS Genexpression in den Nebennieren erhöht. Im Gegensatz zur mRNA war das e- und nNOS-Protein im Nierencortex der 3 Wochen alten SHR stärker exprimiert, als bei gleichaltrigen WKY. Bei 7 Wochen alten Tieren unterschieden sich die entsprechenden Proteinmengen hingegen nicht.

Die Untersuchungen zur Frühphase der Hypertonieentwicklung bei spontan hypertensiven Ratten haben gezeigt, dass es in den Nieren der SH-Ratten mit zunehmendem Alter gleichzeitig zu einer Verringerung der Renin-, COX-2-, eNOS- und nNOS-Genexpression kommt. Dabei ist die Expression dieser Gene bei 7 Wochen alten hypertensiven SHR signifikant verringert gegenüber gleichaltrigen normotensiven WKY. Die ebenfalls untersuchten Proteinmengen der COX-2 und der eNOS- und nNOS Isoenzyme unterscheiden sich jedoch in diesem Alter nicht.

## **7.2 Die Frühphase der Immunsuppressiva-induzierten Hypertonie**

Hypertonie und Nephrotoxizität sind wohlbekannte Nebenwirkungen der Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus. Daher wurde im zweiten Teil der Dissertation die Frühphase der durch diese Immunsuppressiva induzierten Hypertonie untersucht. Um beurteilen zu können, ob die mit der systemischen Calcineurin-Hemmung verbundenen Veränderungen spezifisch sind, wurde auch die durch Calcineurin-unabhängige Signalmechanismen vermittelte Wirkung des mTOR-Hemmers SDZ-RAD untersucht.

Nach 10-tägiger oraler Applikation von Placebo oder Immunsuppressivum (Cyclosporin A (15mg/kg/Tag), Tacrolimus (5mg/kg/Tag), SDZ-RAD (1mg/kg/Tag)) wurden die zu diesem Zeitpunkt 7 Wochen alten, männlichen WKY-Ratten getötet. Die verwendeten Dosierungen waren zwar um ein Vielfaches höher, als die im Humanbereich verwendeten Dosierungen, ihre immunsuppressive Wirkung wurde aber in relevanten Tiermodellen nachgewiesen. Die dadurch erzielten Blutspiegel entsprechen erwiesenermaßen den beim Menschen angestrebten Blutspiegeln.

Es kam während des 10-tägigen Behandlungszeitraumes bei allen drei Wirkstoffen zu einem Anstieg des systolischen Blutdrucks. Die Herzfrequenz wurde durch Calcineurin-Inhibitoren bereits frühzeitig erhöht, bei SDZ-RAD hingegen lediglich am letzten Behandlungstag erniedrigt. Die Myosin-Ratio war dennoch in jeder Verumgruppe signifikant erhöht. Nicht nur die erhöhte Herzfrequenz, sondern auch die bei Calcineurin-Hemmung gesteigerte Noradrenalin-Konzentration der Nierenrinde deuten auf eine Aktivierung sympathischer Nerven. Bei mTOR-Hemmung war dergleichen nicht nachweisbar.

Es ist seit längerer Zeit bekannt, dass Calcineurin-Hemmung die Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NFAT, und dadurch dessen Translokation in den Zellkern, verhindert. Erst vor kurzem wurde entdeckt, dass auch der Cyclooxygenase 2-Promotor spezielle NFAT-Bindungsstellen besitzt und die Bindung von NFAT die Transkription der Cyclooxygenase 2 aktiviert. Da die Niere das COX-2 Isoenzym konstitutiv exprimiert, war daher die Wirkung der Calcineurin-Inhibitoren auf die renale COX-2 Expression von besonderem Interesse.

Es konnte diesbezüglich deutlich gezeigt werden, dass es nur bei Calcineurin-Hemmung zu einer selektiven Verringerung der renokortikalen und medullären Gen- und Proteinexpression der COX-2 kommt. Dies war mit einer signifikanten Reduktion der PGE<sub>2</sub>-Spiegel der Nierenrinde verbunden. Da Cyclosporin A und Tacrolimus gut charakterisierte Inhibitoren der Proteinphosphatase Calcineurin, und somit auch des NFAT-Signalmechanismus, sind, kann hieraus gefolgert werden, dass der NFAT-Mechanismus eine entscheidende Determinante für die



regulierte COX-2 Expression der Niere ist. Die basale Expression der Cyclooxygenase 2 in den tubulären Zellen der Macula densa und in den medullären interstitiellen Zellen scheint somit bereits in vivo vom NFAT-Mechanismus abhängig zu sein. Es wäre daher durchaus vorstellbar, dass die wohlbekannten nierenspezifischen Nebenwirkungen der Calcineurin-Inhibitoren - zumindest teilweise - aus der Hemmung der renalen COX-2 Expression resultieren könnten.

Anhand der Calcineurin-Inhibitoren konnte außerdem gezeigt werden, dass die Hemmung der COX-2 in der Macula densa die basale Renin-Sekretion und -Synthese nicht abschwächt. Es wurde nachgewiesen, dass Cyclosporin A und Tacrolimus die Synthese und Sekretion von Renin erhöhen. Der mTOR-Hemmer SDZ-RAD bewirkte hingegen eine Reduktion der Renin-Genexpression, die Plasmarenin-Aktivität war jedoch ebenfalls erhöht. Die von einigen Forschergruppen nahegelegte Möglichkeit einer Interferenz zwischen der Regulation der COX-2 in der Macula densa und der Sekretion und Synthese von Renin im juxtaglomerulären Apparat erscheint somit unwahrscheinlich.

Auf die Expression der endothelialen und neuronalen NO-Synthase der Niere hatten weder die Calcineurin-Hemmer noch SDZ-RAD Einfluss.

### **7.3 Der Einfluss von Cyclosporin A auf die Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems und der renalen COX-2- und nNOS-Isoenzyme**

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen die Wirkung von Salz-mangel, mit oder ohne zusätzliche Ramipril-induzierte ACE-Hemmung, an mit Cyclosporin A (15mg/kg/Tag) behandelten WKY-Ratten untersucht.

Durch Gabe einer Niedrigsalz-Nahrung kam es gleichzeitig zu einer Steigerung der Renin mRNA des Nierencortex, der Plasmarenin-Aktivität und der renokortikalen Gen- und Proteinexpression von Cyclooxygenase 2 und neuronaler NO-Synthase. Dies wurde durch zusätzliche Blockade des Angiotensin Conversionsenzyms ACE mittels Ramipril noch verstärkt.

Bei mit Cyclosporin A behandelten Ratten konnte die COX-2 Expression bei keiner der beiden Maßnahmen gesteigert werden. Cyclosporin A hemmt daher sowohl die basale als auch die stimulierte COX-2 Expression. Die durch reduzierte Salzzufuhr, bzw. durch Niedrigsalz und ACE-Blockade erhöhte Bildung von PGE<sub>2</sub> im Nierencortex, wurde durch CsA ebenfalls deutlich abgeschwächt. Es erscheint in diesem Zusammenhang naheliegend, dass auch an der stimulierten Expression der COX-2 bei Salz-mangel der NFAT-Mechanismus involviert ist.

Die stimulierte Sekretion und Genexpression von Renin konnte durch die Hemmung der COX-2-Aktivität nicht reduziert werden. Dies verdeutlicht, dass die Stimulation des Reninsystems durch Niedrigsalz und ACE-Inhibitoren im Wesentlichen nicht durch die Aktivität der COX-2 der Macula densa vermittelt wird.

Auf die stimulierte Expression der nNOS hatte Cyclosporin A keinen Einfluss.

## 8 Ausblick

Arterielle Hypertonie ist ein wichtiger Risikofaktor für die zum größten Teil mit kardiovaskulären Erkrankungen verbundene Morbidität und Mortalität der gesamten Bevölkerung. Sie stellt aber auch eine häufige Komplikation nach Organtransplantationen von Niere, Herz, Leber und Knochenmark dar. Diese häufig durch Calcineurin-Inhibitoren verursachte Posttransplantations-Hypertonie ist ein Risikofaktor, sowohl für chronisches Transplantatversagen als auch für frühzeitigen Tod oder Morbidität aufgrund kardiovaskulärer Erkrankungen der Transplantatempfänger.

Ebenso wichtig wie die medikamentöse Behandlung der posttransplantationären Hypertonie ist auch die Entwicklung und der Einsatz von immunsuppressiven Wirkstoffen, die über andere Signalmechanismen, als die der Calcineurin-Inhibitoren, wirken.

Hierzu zählt z.B. der mTOR-Hemmer SDZ-RAD. Aufgrund der synergistischen Wirkung von SDZ-RAD und Cyclosporin A ist eine Kombination beider Wirkstoffe bei gleichzeitiger Dosisreduktion des Calcineurin-Inhibitors ein neues, vielversprechendes Therapiekonzept nach Organtransplantation.

Das Hypertonie dennoch auch bei SDZ-RAD eine nicht nur vereinzelt auftretende Nebenwirkung ist, wurde bereits bei ersten klinischen Studien gezeigt werden. Die bei den vorliegenden Untersuchung gewonnene Erkenntnis, dass SDZ-RAD keinen Einfluss auf die Gen- und Proteinexpression der Cyclooxygenase 2 in den Nieren hat, gibt jedoch Anlass zu der Vermutung, dass bei diesem Wirkstoff das für Calcineurin-Inhibitoren beschriebene nephrotoxische Potential fehlt oder zumindest geringer ist. Bei Nieren-transplantierten Patienten konnte bereits nachgewiesen werden, dass es durch die gleichzeitige Gabe von Cyclosporin A und SDZ-RAD zu niedrigeren Abstoßungsraten, einer größeren Überlebensrate der transplantierten Organe und Patienten, niedrigeren Kreatinin-Werten und einer verbesserten Nierenfunktion kommt (*Nashan, 2002*).

Von einigen Autoren wird mittlerweile auch die Entwicklung von selektiven NFAT-Inhibitoren nahegelegt. Da diese die Aktivität der Proteinphosphatase Calcineurin nicht beeinflussen, sollen dieser zukünftigen Wirkstoffklasse viele der Nebenwirkungen fehlen, die mit der Calcineurin-Hemmung assoziiert werden (*Horsley et al., 2002*).

Aufgrund der im Rahmen der Dissertation gewonnenen Erkenntnisse über eine eventuelle Beteiligung von NFAT an der regulierten COX-2 Expression der Niere, erscheint dies jedoch fraglich. Eine selektive Hemmung des cytoplasmatischen Transkriptionsfaktors NFAT würde im Nierengewebe, und vermutlich auch in anderen NFAT-reichen Geweben, die Expression der Cyclooxygenase 2 supprimieren. Selbst wenn die nephrotoxische Wirkung der Calcineurin-Inhibitoren ein multifaktorielles Geschehen ist, könnte es durch die Hemmung der renalen COX-2 Expression auch bei selektiven NFAT-Inhibitoren zu unerwünschten nephrotoxischen Nebenwirkungen kommen.

Die Suche nach Immunsuppressiva mit neuen molekularen Angriffspunkten bleibt somit unerlässlich.

## 9 Literatur

- Ader JL, Rostaing L. 1998.** Cyclosporin nephrotoxicity: pathology and comparison with FK506. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* **7**: 539-545.
- Akita K, Dusting DJ, Hickey H. 1994.** Suppression of nitric oxide production by cyclosporin A and FK506 in rat vascular smooth muscle cells. *Pharmacol.Physiol.* **21**: 231-233.
- Anderson WP. 1982.** Prostaglandins do not mediate renin release during severe reduction of renal blood flow in conscious dogs. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* **9**: 259-263.
- Andoh TF, Burdman EA, Fransechini N, Houghton DC, Bennett WM. 1996a.** Comparison of acute rapamycin nephrotoxicity with cyclosporine and FK506. *Kidney Int.* **50**: 1110-1117.
- Andoh TF, Gardner MP, Bennett WM. 1997.** Protective effects of dietary L-arginin supplementation on chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* **64**: 1236-1240.
- Andoh TF, Lindsley J, Franceschini N, Bennett WM. 1996b.** Synergistic effects of cyclosporine and rapamycin in a chronic nephrotoxicity model. *Transplantation* **62**: 311-317.
- Aperia A, Ibarra F, Svensson LB, et al. 1992.** Calcineurin mediates alpha-adrenergic stimulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in renal tubule cells. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **89**: 7394-7397.
- Asaad MM, Antonaccio MJ. 1982.** Vascular wall renin in spontaneously hypertensive rats. Potential relevance to hypertension maintenance and antihypertensive effect of captopril. *Hypertension* **4**: 487-493.
- Assis SMA, Monteiro JL, Seguro AC. 1997.** L-Arginine and allopurinol protect against cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* **63**: 1070-1073.
- Bachmann S, Bosse HM, Mundel P. 1995.** Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mamalian kidney. *Am.J.Physiol.* **268**: F885-F898.
- Barajas L. 1979.** Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am.J.Physiol.* **268**: F333-F343.
- Baxter CR, Duggin GG, Hall BM, Horvath JS, Tiller DJ. 1984.** Stimulation of renin release from rat cortical slices by cyclosporin A. *Res.Commun.Pathol.Pharmacol.* **43**: 417-423.
- Beierwaltes WH, Arendshorst WJ, Klemmer PJ. 1982a.** Electrolyte and water balance in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **4**: 908-915.
- Beierwaltes WH, Schryver S, Sanders E, Strand J, Romero JC. 1982.** Renin release selectively stimulated by prostaglandin I<sub>2</sub> in isolated rat glomeruli. *Am.J.Physiol.* **243**: F276-F283.
- Benetos A, Poitevin P, Prost PL, Safar ME, Levy BL. 1994.** Life survival and cardiovascular structures following selective β-blockade in spontaneously hypertensive rats. *Am.J.Hypertens.* **7**: 186-192.
- Bennett WM. 1995.** The nephrotoxicity of immunosuppressive drugs. *Clin.Nephrol.* **43**[Suppl.I]: S3-S7.
- Bennett WM, De Mattos A, Meyer MM, Andoh T, Barry JM. 1996.** Chronic cyclosporine nephropathy: the achilles'heel of immunosuppressive therapy. *Kidney Int.* **50**: 1089-1100.
- Bennett WM, Elzinga L, Kelly V. 1988.** Pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: role of eicosanoids. *Transplant.Proc.* **20**[Suppl.III]: 628-633.
- Berl T, Henrich WL, Erickson AL, Schrier RW. 1979.** Prostaglandins in the beta-adrenergic and baroreceptor-mediated secretion of renin. *Am.J.Physiol.* **236**: F427-F477.
- Bianchi G, Baer PG, Fox U, Duzzi L, Pagetti D, Giovannetti AM. 1975.** Changes in renin, water balance, and sodium balance during development of high blood pressure in genetically hypertensive rats. *Circ.Res.* **36**[Suppl.I]: I153-I161.

- Biondi ML, Romero JC. 1990.** Nitric oxide-mediated reactions stimulate cyclic GMP in the dog kidney. *J.Vasc.Med.Biol.* **2**: 294-298.
- Blackshear JL, Spielman WS, Knox FG, Romero JC. 1979.** Dissociation of renin release and renal vasodilatation by prostaglandin synthesis inhibitors. *Am.J.Physiol.* **237**: F20-F24.
- Bobadilla NA, Gamba G, Tapia E, et al.. 1998.** Role of NO in cyclosporin nephrotoxicity: effects of chronic NO inhibition and NO synthases gene expression. *Am.J.Physiol.* **274**: F791-F798.
- Böhm M, Castellano M, Paul M, Erdmann E. 1994.** Cardiac norepinephrine,  $\beta$ -adrenoceptors, and  $G_i\alpha$ -proteins in prehypertensive and hypertensive spontaneously hypertensive rats. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **23**: 980-987.
- Boluyt MO, Zheng JS, Younes A, et al.. 1997.** Rapamycin inhibits alpha 1-adrenergic receptor-stimulated cardiac myocyte hypertrophy but not activation of hypertrophy-associated genes. Evidence for involvement of p70 S6 kinase. *Circ. Res.* **81**: 176-186.
- Border WA, Noble NA. 1994.** Transforming growth factor  $\beta$  in tissue fibrosis. *N.Engl.J.Med.* **331**: 1286-1292.
- Bosse HM, Böhm R, Resch S, Bachmann S. 1995.** Parallel regulation of constitutive NO-synthase and renin at JGA of rat kidney under various stimuli. *Am.J.Physiol.* **269**: 793-805.
- Briggs JP, Wang W, He X, Brosius FC, Schnermann J. 1993.** Expression of cerebellar cNOS in the kidney cortex: characterization by direct PCR sequencing. (Abstract) *J.Am.Soc.Nephrol.* **3**: 11.
- Brooks DP, Ruffolo RR Jr. 1999.** Pharmacological mechanisms of angiotensin II receptor antagonists: implications for the treatment of elevated systolic blood pressure. *J.Hypertens.* **17**: 27-32.
- Bunchman TE, Brookshire CA. 1991.** Cyclosporine-induced synthesis of endothelin by cultured human endothelial cells. *J.Clin.Invest.* **88**: 310-314.
- Busse R, Luckhoff A, Mulsch A. 1991.** Cellular mechanisms controlling EDRF / NO formation in endothelial cells. *Basic.Res.Cardiol.* **2**: 7-16.
- Butterly DW, Spurney RF, Ruiz P, Griffiths R, Albrightson C, Coffman TM. 2000.** A role for leukotrienes in cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* **57**: 2586-2593.
- Cachofeiro V, Maeso R, Rodrigo E, Navarro J, Ruilope LM, Lahera V. 1995.** Nitric oxide and prostaglandins in the prolonged effects of losartan and ramipril in hypertension. *Hypertension* **26**: 236-243.
- Calne RY, White DJG, Thiru S, Evans DB, Mc Master P, Dunn DC, Craddock GN, Pentlow BD, Rolles K. 1978.** Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet II* 1323.
- Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM. 2000.** Role of the Angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension* **35**: 155-163.
- Castrop H, Kammerl M, Mann B, Jensen BL, Krämer BK, Kurtz A. 2000.** Cyclooxygenase 2 and neuronal nitric oxide synthase expression in the renal cortex are not interdependent in states of salt deficiency. *Pflügers Arch.* **441**: 235-240.
- Castrop H, Schweda F, Schumacher K, Wolf K, Kurtz A. 2001.** The role of renocortical cyclooxygenase-2 for renal vascular resistance and macula densa control of renin secretion. *J.Am.Soc.Nephrol.* **12**: 867-874.
- Chalmers et al.. 1999.** WHO-ISH Hypertension Guidelines Committee. 1999 Guidelines for Management of Hypertension. *J.Hypertens.* **17**: 151-185.
- Chatziantoniou C, Arendshorst WJ. 1991.** Angiotensin and thromboxane in genetically hypertensive rats: renal blood flow and receptor studies. *Am.J.Physiol.* **261 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 30)**: F238-F247.
- Chatziantoniou C, Arendshorst WJ. 1992.** Impaired ability of prostaglandins to buffer renal vasoconstriction in genetically hypertensive rats. *Am.J.Physiol.* **263 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 32)**: F573-F580.
- Chatziantoniou C, Arendshorst WJ. 1993.** Vascular interactions of prostaglandins with thromboxane in kidney of rats developing hypertension. *Am.J.Physiol.* **265 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 34)**: F250-F256.

- Chatziantoniou C, Daniels FH, Arendshorst WJ. 1990.** Exaggerated renal vascular reactivity to angiotensin and thromboxane in young genetically hypertensive rats-. *Am.J.Physiol.* **259 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 28):** F372-F382.
- Chatziantoniou C, Ruan X, Arendshorst WJ. 1995.** Defective G protein activation of the cAMP pathway in the rat kidney during genetic hypertension. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **92:** 2924-2928.
- Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, Miyazaki Y, Ichikawa I, Mc Kanna JA, Harris RC. 1999.** Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. *J.Clin.Invest.* **103:** 953-961.
- Chenh HF, Wang JL, Zhang MZ, Mc Kanna JA, Harris RC. 2000.** Role of p38 in the regulation of renocortical cyclooxygenase-2 expression by extracellular chloride. *J.Clin.Invest.* **106:** 681-688.
- Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, Wang SW, Mc Kanna JA, Harris RC. 2001.** Genetic deletion of COX-2 prevents increased renin expression in response to ACE inhibition. *Am.J.Physiol.Renal.Physiol.* **280:** F449-F456.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987.** Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* **162:** 156-159.
- Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA. 1998.** Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension* **31:** 643-648.
- Chrysostomou A, Walker RG, Russ GR, et al.. 1993.** Diltiazem in renal allograft recipients receiving cyclosporine. *Transplantation* **55:** 300.
- Chung O, Unger T. 1998.** Pharmacology of angiotensin receptors and AT<sub>1</sub> receptor blockers. *Basic Res.Cardiol.* **93[Suppl.2]:** 15-23.
- Clancy RM, Abramson SB. 1995.** Nitric oxide: a novel mediator of inflammation. *Soc.Expl.Biol.Med.* **23:** 93-101.
- Clapham DE. 1995.** Calcium signaling. *Cell* **80:** 259-268.
- Cockcroft JR, Chowienzyk PJ, Benjamin N, Ritter JM. 1994.** Preserved endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. *N.Engl.J.Med.* **330:** 1036-1040.
- Collis MG, De Mey C, Vanhoutte PM. 1980.** Renal vascular reactivity in young spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* **2:** 45-52.
- Cosentino F, Patton S, D'Uscio LV, Werner ER, Werner-Felmayer G, Moreau P, Malinski T, Lüscher TF. 1998.** Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J.Clin.Invest.* **101:** 1530-1537.
- Cowley AW, Roman RJ. 1996.** The role of the kidney in hypertension. *J.Amer.med.Ass.* **275:** 1581-1589.
- Crabtree GR. 1999.** Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin, and NF-AT. *Cell* **96:** 611-614.
- Csikos T, Chung O, Unger T. 1998.** Receptors and their classification: focus on angiotensin II and the AT<sub>2</sub> receptor. *J.Hum.Hypertens.* **12:** 311-318.
- Curtis JJ. 1998.** Posttransplant hypertension. *Transplant.Proc.* **30:** 2009.
- Dahl LK, Heine M, Thompson K. 1974.** Genetic influence of the kidneys on blood pressure. Evidence from chronic renal homografts in rats with opposite predispositions to hypertension. *Circ.Res.* **40:** 94-101.
- Darlametsos I, Morphake P, Bariety J, Hornyh A, Tsipas G, Gkikas G, et al.. 2000a.** Effect of ketanserine on cyclosporine-induced renal dysfunction in rats. *Prost.Leuk. and EFas.* **63:** 263-269.
- Darlametsos I, Papanikolaou EN, Varonos DD. 2000b.** Effect of nifedipin on cyclosporine-induced nephrotoxicity in rats: roles of the thromboxane and endothelin system. *Prost.Leuk. and EFas.* **63:** 263-269.

- Darlametsos I, Varonos DD. 2001.** Role of prostanoids and endothelins in the prevention of cyclosporine-induced nephrotoxicity. *Prost.Leuk. and EFas.* **64:** 231-239.
- Data JL, Gerber JG, Crump WJ, Fröhlich JC, Hollifield JW, Nies AS. 1978.** The prostaglandin system: a role in canine baroreceptor control of renin release. *Circ.Res.* **42:** 454-458.
- Davis JO. 1971.** What signals the kidney to release renin? *Circ.Res.* **28:** 301-306.
- Davis JO, Freeman RH. 1976.** Mechanisms regulating renin release. *Physiol.Rev.* **56:** 1-56.
- Dawson TM, Steiner JP, Dawson VL, et al.. 1993.** Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **90:** 9808-9812.
- De Gasparo T, Siragi HM. 1999.** AT<sub>2</sub> receptor : fact, fancy and fantasy. *Regul.Peptides* **81:** 11-24.
- De Gregorio R, Iniguez MA, Fresno M, Alemany S. 2001.** Cot kinase induces cyclooxygenase-2 expression in T-cells through activation of nuclear factor of activated T cells. *J.Biol.Chem.* **276:** 27003-27009.
- Dehner R, Ikeda K, Yamori Y, Grobecker H. 1990.** Adrenaline in cardiovascular diseases- effect of  $\beta$ -adrenoceptor antagonists. *Z.Kardiol.* **79**[Suppl.3]: 79-88.
- Dehner R, Kees F, Grobecker H. 1989.** Simplified sample treatment and sensitive determination of plasma and tissue catecholamines by HPLC-ECD. 4. *Würzburger Chromatographie-Gespräch, 4.-6.September 1989.*
- De Jong W, Lovenberg W, Sjoerdsma A. 1972.** Increased plasma renin activity in the spontaneously hypertensive rat. *Proc.Soc.Exptl.Biol.Med.* **139:** 1213-1216
- Della Bruna R, Kurtz A, Schricker K. 1996.** Regulation of renin synthesis in the juxtaglomerular cells. *Curr.Opinion Nephrol.Hypertens.* **5 :** 16-17.
- Del Punta K, Charreau EH, Pignataro OP. 1996.** Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* **137:** 5337-5343.
- Di Bona GF. 1989.** Sympathetic nervous system influence on the kidney. Role in hypertension. *Am.J.Hypertens.* **2**[Suppl.] : 119S-124S.
- Di Bona GF, Sawin LL. 1985.** Renal nerve activity in conscious rats during volume expansion and depletion. *Am.J.Physiol.* **248:** F15.
- Di Bona GF, Kopp UC. 1997.** Neural control of renal function. *Physiol.Rev.* **77:** 75-197
- Di Joseph JF, Mihatsch MJ, Sehgal SN. 1994.** Renal effects of rapamycin in the spontaneously hypertensive rat. *Transplant.Int.* **7:** 83f.
- Di Joseph JF, Sharma RN, Chang JY. 1992.** The effect of rapamycin on kidney function in the Sprague-Dawley rat. *Transplantation* **53:** 507f.
- Dilley JR, Stier CT, Arendshorst WJ. 1984.** Abnormalities in glomerular function in rats developing spontaneous hypertension. *Am.J.Physiol.* **246 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 15):** F12-F20.
- Dinchuk JD, Car BD, Focht RJ, Johnston JJ, Jaffee BD, Covington MB, et al.. 1995.** Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* **378:** 406-409.
- Doggrell SA, Brown L. 1998.** Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc.Res.* **39:** 89-105.
- Dumont FJ, Staruch MJ, Koprak SL, et al.. 1992.** The immunosuppressive and toxic effects of FK-506 are mechanistically related: pharmacology of a novel antagonist of FK506 and rapamycin. *J.Exp.Med.* **176:** 751-760.
- Durand DB, Bush MR, Morgan JG, Weiss A, Crabtree GR. 1987.** A 275 bp fragment at the 5' end of the IL-2 gene enhances expression from heterologous promotor in response to signals from the T-cell antigen receptor. *J.Exp.Med.* **165:** 395-407.

- Duruibe VA, Okonman A, Pantan L, Blyden GT. 1990.** Effect of cyclosporine-A on rat catecholamines. *Life Sci.* **47**: 255-261.
- Dzau VJ, Burt DW, Pratt RE. 1988.** Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Am.J.Physiol.* **255**: F563-F573.
- Ehmke H, Persson PB, Hackenthal E, Schweer H, Seyberth HJW, Kirchheim HR. 1993.** Is arterial pressure a determinant of renal prostaglandin release? *Am.J.Physiol.* **26**: R402-R408.
- Elzinga LW, Rosen S, Bennett WM. 1993.** Dissociation of glomerular filtration rate from tubulointerstitial fibrosis in experimental chronic cyclosporine nephropathy: role of sodium intake. *J.Am.Soc.Nephrol.* **4**: 214.
- Elzinga LW, Rosen S, Burdman EA, Hatton DC, Lindsley J, Bennett WM. 2000.** The role of renal sympathetic nerves in chronic cyclosporine nephropathy. *Transplantation* **69**: 2149-2153.
- English JE, Evan A, Houghton DC, Bennett WM. 1987.** Cyclosporine-induced acute renal dysfunction in the rat. *Transplantation* **44**: 135-141.
- Epstein A, Beall A, Winn J, Mulloy L, Brophy CM. 1998.** Cyclosporine, but not FK506 selectively induces renal and coronary smooth muscle contraction. *Surgery* **123**: 456-460.
- Evenwel RT, Kasbergen CM, Stuyker-Boudier HA. 1983.** Central and regional hemodynamics and plasma volume distribution during the development of spontaneous hypertension in rats. *Clin.Exp.Hypertens.PartA. Theory.Pract.* **5** : 1511-1536.
- Fanger GR, Gerwins P, Widman C, Jarpe MB, Johnson GL. 1997.** MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr.Opin.Genet.Dev.* **7**: 67-74.
- Fast DJ, Lynch RC, Leu RW. 1993.** Cyclosporin A inhibits nitric oxide production by L929 cells in response to tumor necrosis factor and interferon-gamma. *J.Interferon Res.* **13**: 235-240.
- Faulds D, Goa KL, Benfield P. 1993.** Cyclosporin: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders. *Drugs* **45**: 955-1013.
- Feng L, Sun W, Xia Y, Tang WW, Channugam P, Soyoola E, Wilson CB, Hwang D. 1993.** Cloning of two isoforms of rat cyclooxygenase : Differential regulation of their expression. *Arch.Biochem.Biophys.* **307**: 361-368.
- Ferrone RA, Antonaccio MJ. 1979.** Prevention of the development of spontaneous hypertension in rats by captopril (SQ 14,225). *Eur.J.Pharmacol.* **60**: 131-137.
- Feutren G, Mihatsch MJ. 1992.** Risk factors for cyclosporine-induced nephropathy in patients with autoimmune diseases. *New Engl.J.Med.* **326**: 1654-1660.
- Flanagan WM, Corthesy B, Bram RJ, Crabtree GR. 1991.** Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and Cyclosporine A. *Nature* **352**: 803-807.
- Folkow B. 1993.** Early structural changes in hypertension: pathophysiology and clinical consequences. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **22**[Suppl.1]: S1-S6.
- Forstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, et al.. 1991.** Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **88**: 1788-1792.
- Fraser ED, Walsh MP. 1995.** Dephosphorylation of calponin by type 2B protein phosphatase. *Biochemistry* **34**: 9151-9158.
- Freeman RH, Davis JO, Villareal D. 1984.** Role of prostaglandins in the control of renin release. *Circ.Res.* **54**: 1-9.
- Freeman RH, Davis JO, Varsano-Aharon N, Ulick S, Weinberger MH. 1975.** Control of aldosterone secretion in the spontaneously hypertensive rat. *Circ.Res.* **37**: 66-71.
- Friedman J, Weissman I. 1991.** Two cytoplasmatic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin: one in the presence and one in the absence of CsA. *Cell* **66**: 799-806.

- Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ. 1992.** Calcineurinphosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **89**: 3686-3690.
- Fung JJ, Alessiani M, Abu-Elmaged K, et al.. 1991.** Adverse effects associated with the use of FK506. *Transpl.Proc.* **13**: 3105-3109.
- Galloway MP, Westfall TC. 1982.** The release of endogenous norepinephrine from the coccygeal artery of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Circ.Res.* **51**: 225-232.
- Ganten D, Hermann K, Bayer C, Unger T, Lang RE. 1983.** Angiotensin synthesis in the brain and increased turnover in hypertensive rats. *Science* **221**: 869-871.
- Garavito MR, De Witt DL. 1999.** The cyclooxygenase isoforms: structural insight into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim.Biophys.Acta.* **1441**: 278-287.
- Gattone VH, Evan AP, Willis LR, Luft FC. 1983.** Renal afferent arteriole in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* **5**: 8-16.
- Golbaekdal K, Nielsen CB, Pedersen EB. 1996.** The acute effects of FK-506 on renal haemodynamics, water and sodium excretion and plasma levels of angiotensin II, aldosterone, atrial natriuretic peptide and vasopressin in pigs. **48**: 1174-1179.
- Göthberg G, Folkow B. 1983.** Age-dependent alterations in the structurally determined vascular resistance, pre- to postglomerular resistance ratio and glomerular filtration capacity in kidneys, as studied in aging normotensive rats and spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol.Scand.* **117**: 547-555.
- Göthel SF, Marahiel MA. 1999.** Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell.Mol.Life Sci.* **55**: 423-436.
- Graef IA, Chen L, Crabtree GR. 2001.** NFAT signaling in vertebrate development. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **11**: 502-512.
- Grobecker H. 1991.** Hemmstoffe des Konversionsenzym. Pharmakologie und klinische Pharmakologie. Basel: Aesopus Verl..
- Grobecker H. 1999.** Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten: Pharmakologie und therapeutische Anwendung. Stuttgart; *Wiss. Verl.-Ges.*.
- Grobecker H, Krämer BK. 1996.** Betarezeptoren-Antagonisten. Pharmakologische und therapeutische Anwendung. Stuttgart: Wiss.Verl.-Ges..
- Grobecker H, Riebel K, Wellenhofer T. 1995.** Cyclosporine A-induced hypertension in SHR and WKY: Role of the sympatho-adrenal system. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol. Suppl.I*: S94-S95.
- Grobecker H, Roizen MF, Jacobwitz DM, Kopin IJ. 1977.** Effect of prolonged treatment with adrenergic neuron blocking drugs on sympatho-adrenal reactivity in rats. *Eur.J.Pharmacol.* **46**: 125-133.
- Grobecker H, Roizen MF, Kopin IJ. 1977.** Effect of tyramine and guanethidine on dopamine-beta-hydroxylase activity and norepinephrine concentrations in vesicular fraction of the heart and plasma of rats. *Life Sci.* **20**: 1009-1015.
- Grobecker H, Roizen MF, Weise V, Saavedra JM, Kopin IJ. 1977.** Letter: Sympathoadrenal medullary activity in young, spontaneously hypertensive rats. *Nature* **258**: 267-268.
- Grobecker H, Saavedra JM, McCarthy R, Chiueh CC, Kopin IJ. 1977.** Dopamine-beta-hydroxylase activity and catecholamine concentrations in plasma: experimental and essential hypertension. *Postgrad.Med.J.* **53**[Suppl.3]: 43-48.
- Grobecker H, Saavedra JM, Weise VK. 1982.** Biosynthetic enzyme activities and catecholamines in adrenal glands of genetic and experimental hypertensive rats. *Circ.Res.* **50**: 742-746.



- Groth CG, Backman L, Morales JM, Caine R, Kreis H, Lang P, et al. 1999.** Sirolimus (rapamycin)-based therapy in human renal transplantation: similar efficacy and different toxicity compared with cyclosporine. Sirolimus European Renal Transplant Study Group. *Transplantation* **67**: 1036-1042.
- Gueyffier F, Boissel JP, Pocock S, Boutitie F, et al. 1999.** Identification of risk factors in hypertensive patients : contribution of randomized controlled trials through an individual patient database. *Circulation* **100**: e88-e94.
- Guyton AC, Coleman TG, Wilcox CS. 1999.** Quantitative analysis of the pathophysiology of hypertension. *J.Am.Soc.Nephrol.* **10**: 2248-2258.
- Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. 1990.** Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol.Rev.* **70**: 1067-1116.
- Hao CM, Yull F, Blackwell T, Komhoff M, Bavis LS, Breyer MD. 2000.** Dehydration activates an NF-kappaB-driven, COX-2 dependent survival mechanism in renal medullary interstitial cells. *J.Clin.Invest.* **106**: 973-982.
- Harap SB. 1992.** A developmental genetic mechanism involving angiotensin in spontaneously hypertensive rats. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.Suppl.* **19**: 19-22.
- Harding P, Carretero OA, Beierwaltes WH. 2000.** Chronic cyclooxygenase-2 inhibition blunts low sodium-stimulated renin without changing renal haemodynamics. *J.Hypertens.* **18**: 1107-1113.
- Hardman et al. 1998.** Goodman & Gilman pharmakologische Grundlagen der Arzneimitteltherapie. Frankfurt am Main; McGraw-Hill Verl..
- Harris RC. 2000.** Cyclooxygenase-2 in the kidney. *Am.J.Soc.Nephrol.* **11**: 2387-2394.
- Harris RC, Breyer MD. 2001.** Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. *Am.J.Physiol.Renal.Physiol.* **281**: F1-F11.
- Harris RC, Mc Kanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, BreyerMD. 1994.** Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J.Clin.Invest.* **94**: 2504-2510.
- Hartner A, Goppelt-Strübe M, Hilgers KF. 1998.** Coordinate expression of cyclooxygenase-2 and renin in the rat kidney in renovascular hypertension. *Hypertension* **31**: 201-205.
- Haws RM, Shaul PW, Arant BS, Atiyeh BA. 1994.** Glomerular losartan (DuP 753)-sensitive angiotensin II receptor density is increased in young spontaneously hypertensive rats. *Pediatr.Res.* **35**: 671-676.
- Hayakawa H, Raij L. 1998.** Nitric oxide synthase activity and renal injury in genetic hypertension. *Hypertension* **31**[part2]: 266-270.
- Hennington BS, Zhang H, Miller MT, Granger JP, Reckelhoff JF. 1998.** Angiotensin II stimulates synthesis of endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension* **31**: 283-288.
- Herlitz H, Rickstein SE, Lundin S, Thoren P, Aurell M, Berglund G. 1983.** Renal denervation and sodium balance in young spontaneously hypertensive rats. *Renal Physiol.* **6**: 145-150.
- Hernandez GL, Volpert OV, Iniguez MA, Lorenzo E, Martinez-Martinez S, Grau R, Fresno M, Redondo JM. 2001.** Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by Cyclosporine A: Roles of nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *J.Exp.Med.* **193**: 607-620.
- Hinz B, Brune K. 1999.** COX-1 und COX-2: Funktionen und pharmakologische Beeinflussung. *Pharmazie in unserer Zeit* **28**: 21-29.
- Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, Fiorentino D, Nourse J, Crabtree GR. 1996.** The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin.Immunol.Immunopathol.* **80**: S40-S45.
- Höcherl K. 2000.** Angiotensin-II Rezeptor-Antagonisten: Untersuchungen zur Genexpression des Renin-Angiotensin-Systems in Herz, Nieren und Nebennieren.
- Höcherl K, Kammerl M, Kees F, Krämer BK, Grobecker HF, Kurtz A. 2002.** Role of renal nerves in stimulation of renin, COX-2, and nNOS in rat renal cortex during salt deficiency. *Am.J.Physiol.Renal Physiol.* **282** : F478-F484.

- Höcherl K, Wolf K, Castrop H, Ittner KP, Bucher M, Kees F, Grobecker HF, Kurtz A. 2001.** Renocortical expression of renin in response to angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor blockade is closely coordinated but not causally linked. *Pflügers Arch.* **442**: 821-827.
- Holmer S, Eckard KU, Lehir M, Schricker K, Riegger G, Kurtz A. 1993.** Influence of dietary NaCl intake on renin gene expression in the kidneys and adrenal glands of rats. *Eur.J.Physiol.* **425**: 62-67.
- Holmer SR, Kaissling B, Putnik K, Pfeifer M, Krämer BK, Riegger AJ, Kurtz A. 1997.** Beta-adrenergic stimulation of renin gene expression in vivo. *J.Hypertens.* **15**: 1471-1479.
- Horsley V, Pavlath GK. 2002.** NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaption. *J.Cell Biol.* **156**: 771-774.
- Hoye T, Sun YL, Williamson K, Xu X. 1995.** Isolation of the two members of the NFAT gene family and functional characterization of the NFAT proteins. *Immunity* **2**: 461-472.
- Huang Z, Huang PL, Ma J, Meng W, Ayata C, Fishman MC, Moskowitz MA. 1996.** Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J.Cereb.Blood.Flow.Metab.* **16**: 981-987.
- Hunter T. 1997.** Oncoprotein networks. *Cell* **88**: 333-346.
- Ichihara A, Imig JD, Navar LG. 1999.** Cyclooxygenase-2 modulates afferent arteriolar responses to increases in pressure. *Hypertension* **34**: 843-847.
- Imagawa J, Miayuichi T, Satoh S. 1985.** Participation of prostaglandin and adrenergic nervous system in renin release induced by changes in renal arterial pressure in rats. *Renal Physiol.* **8**: 140-149.
- Iniguez MA, Martinez-Martinez S, Punzon C, Redondo JM, Fresno M. 2000.** An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J.Biol.Chem.* **275**: 23627-23635.
- Inoue H, Yokoyama C, Hara S, Tone Y, Tanabe T. 1995.** Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element. *J.Biol.Chem.* **270**: 24965-24971.
- Ivery MTG. 1999.** A proposed molecular model for the interaction of calcineurin with the Cyclosporin A-Cyclophilin A complex. *Bioorg.Med.Chem.* **7**: 1389-1402.
- Jensen BL, Kurtz A. 1997.** Differential regulation of renal cyclooxygenase mRNA by dietary salt intake. *Kidney Int.* **52**: 1242-1249.
- Jensen BL, Schmid C, Kurtz A. 1996.** Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells. *Am.J.Physiol.* **271**: F659-F669.
- Johns DW, Peach MJ, Gomez RA, Inagami T, Carey RM. 1990.** Angiotensin II regulates renin gene expression. *Am.J.Physiol.* **259**: F882-F887.
- Kahan BD, Camardo JS. 2001.** Rapamycin: Clinical results and future opportunities. *Transplantation* **72**: 1181-1193.
- Kang PM, Landau AJ, Eberhardt RT, Frishman WH. 1994.** Angiotensin II receptor antagonists: A new approach to blockade of the renin-angiotensin system. *Am.Heart.J.* **127**: 1388-1401.
- Keeton K, Campbell WB. 1981.** The effects of altered sodium balance and adrenergic blockade on renin release induced in rats by angiotensin antagonism. *Circ.Res.* **38**: 531-539.
- Khanna A. 2000.** Mechanism of the combination of immunosuppressive effects of rapamycin with either cyclosporine or tacrolimus. *Transplantation* **70**: 690-694.
- Khanna A, Bresnahan B, Plummer M, et al.. 1999a.** Intra-renal expression of fibrogenic genes in renal allografts with tacrolimus and cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* **67**: S84.

- Khanna A, Cairns V, Becker CG, Hosenpud JD. 1999b.** Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) mimics and anti-TGF- $\beta$  antibody abrogates the in-vivo effects of Cyclosporine: demonstration of a direct role of TGF- $\beta$  immunosuppression and nephrotoxicity of CsA. *Transplantation* **67**: 882.
- Kimball PM, Kerman RK, Van Buren CT, Lewis RM, Katz S, Kahan BD. 1993.** Cyclosporine and rapamycin affect protein kinase C induction of the intracellular activation signal, activator of DNA replication. *Transplantation* **55**: 1128.
- Kimura K, Nanba S, Tojo A, Hirata Y, Matsuoka H, Sugimoto T. 1989.** Variations in arterioles in spontaneously hypertensive rats. Morphometric analysis of afferent and efferent arterioles. *Virchows Arch. A.Pathol.Anat.Histopathol.* **415**: 565-569.
- Kirk AD, Jacobson LM, Heisey DM, Fass NA, Sollinger HW, Pirsch JD. 1997.** Posttransplant diastolic hypertension: associations with intragraft transforming growth factor-beta, endothelin, and renin transcription. *Transplantation* **64**: 1716-1720.
- Klee CB, Crouch TH, Krinks MH. 1979.** Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **76**: 6270-6273.
- Klee CB, Ren H, Wang X. 1998.** Regulation of the Calmodulin-stimulated Protein Phosphatase, Calcineurin. *J.Biol.Chem.* **22**: 13367-13370.
- Kline RL. 1987.** Renal nerves and experimental hypertension: evidence and controversy. *Cand.J.Physiol.Pharmacol.* **65** : 1540-1547.
- Komers R, Anderson S, Epstein M. 2001.** Renal and cardiovascular effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Am.J.Kidney.Dis.* **38**: 1145-1157.
- Komhoff M, Grone HJ, Klein T, Seyberth HW, Nusing RM. 1997.** Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney : implication for renal function. *Am.J.Physiol.* **272**: 460-468.
- Kon V, Ichikawa I. 1983.** Effector loci for renal nerve control of cortical microcirculation. *Am.J.Physiol.* **245**: F545.
- Kraemer S, Meade E, De Witt D. 1992.** Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure. *Arch.Biochem.Biophys.* **293**: 391-400.
- Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. 1995.** Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol.Chem.* **376**: 327-343.
- Kujubu DA, Fletscher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. 1991.** TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J.Biol.Chem.* **266**: 12866-12872.
- Kumano K, Wang G, Endo T, Kuwao S. 1991.** FK506-induced nephrotoxicity in rats. *Transplant.Proc.* **23**: 512-515.
- Kurtz A, Della Bruna R, Kühn K. 1988a.** Cyclosporine A enhances renin secretion and production in isolated juxtaglomerular cells. *Kidney Int.* **33**: 947-953.
- Kurtz A, Della Bruna R, Pfeilschifter J, Bauer C. 1988a.** Role of cGMP as second messenger of adenosine in the inhibition of renin release. *Kidney Int.* **33**: 798-803.
- Kurtz A, Della Bruna R, Taugner R, Bauer C. 1986a.** Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from isolated renal juxtaglomerular cells by cGMP-mediated process. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **83**: 4769-4773.
- Kurtz A, Götz KH, Hamann m, Wagner C. 1998.** Stimulation of renin secretion by nitric oxide is mediated by phosphodiesterase 3. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **95**: 4743-4747.
- Kurtz A, Pfeilschifter J, Hutter A, Bührle C, Nobiling T, Taugner R, Hackenthal E, Bauer C. 1986b.** Role of protein kinase C in inhibition of renin release caused by vasoconstrictors. *Am.J.Physiol.* **250**: C563-C571.
- Lai JH, Tan TH. 1994.** CD28 signaling causes a sustained down-regulation of I kappa B alpha which can be prevented by the immunosuppressant rapamycin. *J.Biol.Chem.* **269**: 30077.

- Lanese DM, Conger JG. 1993.** Effects of endothelin receptor antagonists on cyclosporine-induced vasoconstriction in isolated rat renal arterioles. *J.Clin.Invest.* **91**: 2144-2149.
- Laskow DA, Vicenti F, Neylan YF, Mendez R, Matas AJ. 1996.** An open-label, concentration-ranging trial of FK506 in primary kidney transplantation: A report of the United States Multicenter FK506 Kidney Transplant Group. *Transplantation* **62**: 900-905.
- Lea JP, Sands JM, Mc Mahon SJ, Tumlin JA. 1994.** Evidence that the inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity by FK506 involves calcineurin. *Kidney Int.* **46**: 647-652.
- Lee DBN. 1997.** Cyclosporine and the renin-angiotensin axis. *Kidney Int.* **52**: 248-260.
- Lewis RM. 1995.** Long-term use of cyclosporine A does not adversely impact on clinical outcomes following renal transplantation. *Kidney Int.* **48**[Suppl.52]: S75-S78.
- Lim HW, De Windt LJ, Mante J, et al.. 2000.** Reversal of cardiac hypertrophy in transgenic disease models by calcineurin inhibition. *J.Mol.Cell.Cardiol.* **32**: 697-709.
- Lin KF, Chao L, Chao J. 1997.** Prolonged reduction of high blood pressure with human nitric oxide synthase gene delivery. *Hypertension* **30**: 307-313.
- Lindpaintner K, Kreutz R, Ganten D. 1992.** Genetic variation in hypertensive and control strains. What are we controlling for anyway? *Hypertension* **19**: 428-430.
- Liu J. 1991.** Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**: 807-815.
- Liu J, Albers MW, Wandless TJ, et al.. 1992.** Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. *Biochemistry* **31**: 3896-3901.
- Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. 1991.** Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**: 807-815.
- Loh C; Carew JA, Kim J, Hogan PG, Rao A. 1996.** T-cell receptor stimulation elicits an early phase of activation and a later phase of deactivation of the transcription factor NFAT1. *Mol.Cell.Biol.* **16**: 3945-3954.
- Luengo JI, Yamashita DS, Dunnington D, et al.. 1995.** Structure-activity studies of rapamycin analogs: evidence that the c-7 methoxy group is part of the effector domain and positioned at the FKBP12-FRAP interface. *Chem.Biol.* **2**: 471.
- Lundin SA, Hallbäck-Norlander M. 1980.** Background of hyperkinetic circulatory state in young spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc.Res.* **14**: 561-567.
- Luscher TF, Dohi Y, Tschudi M. 1992.** Endothelium-dependent regulation of resistance arteries: alterations with aging and hypertension. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **19**[Suppl.5]: S34-42.
- Lustig S, Eggena P, Barrett J, Stern N, Lee DBN. 1988.** Further studies on cyclosporine-induced hyperreninemic hypoaldosteronism: Evidence for a direct stimulatory action on renin release. *Kidney Int.* **33**: 274.
- Lustig S, Stern N, Eggena P, Tuck ML, Lee DBN. 1987.** The effect of cyclosporine A on blood pressure and renin-angiotensin-aldosterone axis in spontaneously hypertensive rats. *Am.J.Physiol.* **253**: H1596-H1600.
- Lyson T, Ermel LD, Belshaw PJ, Alberg DG, Schreiber SL, Victor RG. 1993.** Cyclosporine- and FK506-induced sympathetic activation correlates with calcineurin-mediated inhibition of T-cell signaling. *Circ.Res.* **73**: 596-602.
- Lyson T, Mc Mullan DM, Ermel LD, et al.. 1994.** Mechanism of cyclosporine-induced activation and acute hypertension in rats. *Hypertension* **23**: 667-675.
- Mann B, Hartner A, Jensen BL, Hilgers KF, Höcherl K, Krämer BK, Kurtz A. 2001.** Acute upregulation of COX-2 by renal artery stenosis. *Am.J.Physiol.Renal.Physiol.* **271**: F659-F669.
- Marumo T, Nakaki T, Hishikawa K, et al.. 1995.** Cyclosporine A inhibits nitric oxide synthase induction in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **25**[4,Pt 2]: 764-768.

- Mason J, Müller-Schweinitzer E, Dupont M, Casellas D, Mihatsch M, Moore L, Kaskel F. 1991.** Cyclosporine and the renin-angiotensin system. *Kidney Int.* **39**[Suppl.2]: S28-S32.
- Mattson DL, Higgins DJ. 1996.** Influence of dietary sodium intake on renal medullary nitric oxide synthase. *Hypertension* **27**: 688-692.
- Mattson DL, Wu F. 2000.** Control of arterial blood pressure and renal sodium excretion by nitric oxide synthase in the renal medulla. *Acta Physiol.Scand.* **168**: 149-154.
- Mc Anulty RJ, Hernandez-Rodriguez NA, Mutsaers SE, Coker RK, Laurent GJ. 1997.** Indomethacin suppresses the anti-proliferative effects of transforming growth factor- $\beta$  isoforms on fibroblast cell cultures. *Biochem.J.* **321**: 639-643.
- Mc Diarmid SV, Busuttil RW, Ascher NL, et al.. 1995.** FK 506 (Tacrolimus) compared with cyclosporine for primary immunosuppression after pediatric liver transplantation. Results from the U.S. Multicentre Trial. *Transplantation* **59**: 530-536.
- Michel T, Feron O. 1997.** Nitric oxide synthases : which, where, how, and why? *J.Clin.Invest.* **100**: 2146-2152.
- Mihatsch MJ, Kyo M, Morozumi K, Yanaguchi Y, Nickeleit V, Ryffel B. 1998.** The side-effects of ciclosporine-A and tacrolimus. *Clin.Nephrol.* **49**: 356.
- Mihatsch MJ, Thiel G, Spichtin HP, Oberholzer M, et al.. 1983.** Morphological findings in kidney transplants after treatment with cyclosporine. *Transplant.Proc.* **15**[Suppl.1]: 2821-2835.
- Mihatsch MJ, Steiner K, Abeywickrama KH, Landmann J, Thiel G. 1988a.** Risk factors for the development of chronic cyclosporine-nephrotoxicity. *Clin.Nephrol.* **29**: 165-175.
- Mihatsch MJ, Thiel G, Ryffel B. 1988b.** Histopathology of cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant.Proc.* **20**[Suppl.3]: 759-771.
- Millatt LJ, Abdel-Rahman EM, Siragy HM. 1999.** Angiotensin II and nitric oxide: a question of balance. *Regulatory Peptides* **81**: 1-10.
- Minami N, Imai Y, Hashimoto J, Abe K. 1995.** Contribution of vascular nitric oxide to basal blood pressure in conscious spontaneously hypertensive rats and normotensive Wistar Kyoto rats. *Clin.Sci.* **89**: 177-182.
- Minamino T, Kitakaze M, Ueda Y, Asanuma H, Papst PJ, Kuzuya T, Hori M. 2000.** Chronic treatment with FK506 increases p70 S6 kinase activity associated with reduced nitric oxide synthase activity in rabbit hearts. *Cardiovasc.Drugs Ther.* **14**: 329-336.
- Mittal CK, Jadhav AL. 1994.** Calcium-dependent inhibition of constitutive nitric oxide synthase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **203**: 8-15.
- Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S, Hayaishi O. 1976.** Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J.Biol.Chem.* **251**: 2629-2636.
- Miyoshi J, Higashi T, Mukai H, Ohuchi T, Kakunaga T. 1991.** Structure and transforming potential of the human cot oncogene encoding a putative protein kinase. *Mol.Cell.Biol.* **11**: 4088-4096.
- Modena B, Holmer S, Eckardt KU, Schricker K, Riegger G, Kaissling B, Kurtz A. 1993.** Furosemide stimulates renin expression in the kidneys of salt-supplemented rats. *Pflügers Arch.* **260**: 403-409.
- Moffet RB, McGowan RA, Gross KW. 1986.** Modulation of kidney renin messenger RNA levels during experimentally induced hypertension. *Hypertension* **8**: 874-882.
- Moncada S, Higgs EA. 1995.** Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* **9**: 1319-1330.
- Morham SG, Lagenbach R, Loftin CD, Tiano HF, Vouloumanos N, et al.. 1995.** Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* **83**: 473-482.

- Moridani BA, Kline RL. 1996.** Effect of endogenous l-arginine on the measurement of nitric oxide synthase activity in the rat kidney. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* **74** : 1210-1214.
- Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, De Witt DL, Smith WL. 1995.** Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J.Biol.Chem.* **270**: 10902-10908.
- Morris JC, Ping-Sheng L, Zhai HX, Shen TY, Mensa-Wilmot K. 1996.** Phosphatidylinositol phospholipase C is activated allosterically by the aminoglycoside G418. 2-deoxy-2-fluoro-scylo-inositol-1-O-dodecylphosphonate and its analogs inhibit glycosylphosphatidylinositol phospholipase C. *J.Biol.Chem.* **271**: 15468-15477.
- Muirhead EE, Prewitt RL, Brooks B, Brosius WL. 1978.** Antihypertensive action of the orally active converting enzyme inhibitor (SQ 14,225) in spontaneously hypertensive rats. *Circ.Res.* **43**[Suppl.1]: I53-I59.
- Mundel P, Bachmann S, Bader M, Fischer A, Kummer W, Mayer B, Kriz W. 1992.** Expression of nitric oxide synthase in macula densa cells. *Kidney.Int.* **42**: 1017-1019.
- Myers BD, Ross J, Newton L, Luetscher J, Perlroth M. 1984.** Cyclosporine-associated chronic nephropathy. *N.Engl.J.Med.* **311**: 699-705.
- Nabika T, Nara Y, Ikeda K, Endo J, Yamori Y. 1991.** Genetic heterogeneity of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* **18**: 12-16.
- Nagaoka AM, Kakihana M, Shibota M, Fujiwara K, Shimakawa K. 1982.** Reduced sodium excretory ability in young spontaneously hypertensive rats. *Jpn.J.Pharmacol.* **32**: 839-844.
- Nakata Y, Yoshibayashi M, Yonemura T, Uemoto S, Inomata Y, Tanaka K, Furosho K. 2000.** Tacrolimus and myocardial hypertrophy. *Transplantation* **69**: 1960-1962.
- Nakatani T, Uchida J, Asai T, Yoshimura R, Kim T, Miura K, Kishimoto T. 2001.** Effect of tacrolimus on the gene expression of renin and endothelin in the rat kidney. *Transplant.Proc.* **33**: 2296-2297.
- Nantel F, Meadows E, Denis D, Connolly B, Metters KM, Giaid A. 1999.** Immunolocalization of cyclooxygenase-2 in the macula densa of human elderly. *FEBS Lett.* **1999**: 475-477.
- Naruse M, Inagami T. 1982.** Markedly elevated specific renin levels in the adrenal in genetically hypertensive rats. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **79**: 3295-3299.
- Nashan B. 2002.** Early clinical experience with a novel rapamycin derivative. *Ther.Drug.Monitor.* **24**: 53-58.
- O'Banion MK, Winn VD, Young DA. 1992.** cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **89**: 4888-4892.
- Ochiai T, Isono K. 1991.** Pharmacokinetics and clinical effects of FK 506. *Biotherapy* **5**: 1531-1536.
- Okamoto K, Aoki K. 1963.** Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn.Circ. J.* **27**: 282-293.
- O'Keefe SJ, Tamura J, Kincaid RF, Tocci MJ, O'Neill MA. 1992.** FK506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promotor by calcineurin. *Nature* **357**: 692-694.
- Olyaei AJ, De Mattos AM, Bennett WM. 1999.** Immunosuppressant-induced nephropathy: pathophysiology, incidence and management. *Drug.Saf.* **21**: 471-488.
- O'Neill GP, Ford-Hutchinson AW. 1993.** Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett.* **330**: 156-160.
- Oparil SW, Sriprajothikoon W, Wyss JM. 1987.** The renal afferent nerves in the pathogenesis of hypertension. *Cand.J.Physiol.Pharmacol.* **65**: 1548-1558.
- Pak CH. 1981.** Plasma adrenaline and noradrenaline concentrations of the spontaneously hypertensive rat. *Jpn.Heart J.* **22**: 987-995.
- Panza JA, Garcia CE, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Cannon ROI. 1995.** Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. *Circulation* **91**: 1732-1738.

- Patriotis C, Makris A, Bear SE, Tschlis PN. 1993.** Tumor progression locus 2 (TPL-2) encodes a protein kinase involved in the progression of rodent T-cell lymphomas and in T-cell activation. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **90**: 2251-2255.
- Patschan O, Kuttler B, Heemann U, Uber A, Rettig R. 1997.** Kidneys from normotensive donors lower blood pressure in young transplanted spontaneously hypertensive rats. *Am.J.Physiol.Regulatory Integrative Comp.Physiol.* **273**: R175-R180.
- Pinto YM, Paul M, Ganten D. 1998.** Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc.Res.* **39**: 77-88.
- Platz KP, Mueller AR, Blumhardt G, et al.. 1994.** Nephrotoxicity following orthotopic liver transplantation. A comparison between cyclosporin and FK506. *Transplantation* **58**: 170-177,
- Plosker GL, Foster RH. 2000.** Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs* **59**: 323-389.
- Podder H, Stepkowski SM, Napoli KL, et al.. 2001.** Pharmacokinetic interactions augment toxicities of sirolimus/cyclosporine combinations. *J.Am.Soc.Nephrol.* **12**: 1059.
- Radermacher J, Meiners M, Bramlage C, Klien V, Behrend M, Schlitt HJ, Pichlmayer R, Koch KM, Brunkhorst R. 1998.** Pronounced renal vasoconstriction and systemic hypertension in renal transplant patients treated with cyclosporine A versus FK506. *Transplant Int.* **11**: 3-10.
- Rao A, Luo C, Hogan PG. 1997.** Transcription gactors of the NFAT family: regulation and function. *Annu.Rev.Immunol.* **15**: 707-747.
- Remuzzi G, Bertani T. 1989.** Renal vascular and thrombotic effects of cyclosporine. *Am.J.Kidn.Dis.* **13**: 261-272.
- Rettig R, Folberth CG, Stauss H, Kopf D, Waldherr R, Baldauf G, Unger T. 1991.** Post-transplantation hypertension in recipients of renal grafts from hypertensive donor rats. *Cli.Invest.Med.* **14**: 492-498.
- Rettig R, Schmitt B, Pelzl B, Speck T. 1993.** The kidney and primary hypertension: Contributions from renal transplantation studies in animals and humans. *J.Hypertens.* **11**: 883-891.
- Randhawa PS, Shapiro R, Jordan ML, Starzl TE, Demetris AJ. 1993.** The histopathological changes associated with allograft rejection and drug toxicity in renal transplant recipients maintained on FK506; clinical significance and comparison with cyclosporine. *Am.J.Surg.Pathol.* **17**: 60-68.
- Rodgers TS, Elzinza L, Bennet WM, Kelley VE. 1988.** Selective enhancement of thromboxane in macrophages and kidneys in cyclosporine induced nephrotoxicity. *Transplantation* **45**: 153-156.
- Rodriguez F, Llinas MT, Gonzales JD, Rivera J, Salazar FJ. 2000.** Renal changes induced by a cyclooxygenase-2 inhibitor during normal and low sodium intake. *Hypertension* **36**: 276-281.
- Rodriguez F, Llinas MT, Gonzales JD, Salazar FJ. 1999.** Renal changes induced by cyclooxygenase 2 (cox-2) inhibition during normal and low sodium intake [Abstract]. *FASEB J.* **13**[5]: A721.
- Roizen MF, Weise V, Grobecker H, Kopin IJ. 1975.** Plasma catecholamines and Dopamin- $\beta$ -hydroxylase activity in spontaneously hypertensive rats. *Life sci.* **17**: 283-288.
- Rose G. 1992.** The strategy of preventive medicine. *Oxford University Press, Oxford.*
- Rossat J, Maillard M, Nussberger J, Brunner HR, Burnier M. 1999.** Renal effects of selective cyclooxygenase-2 inhibition in normotensive salt-depleted subjects. *Clin.Pharmacol.* **66**: 76-84.
- Ruff VA, Leach KL. 1995.** Direct demonstration of NFATp dephosphorylation and nuclear localisation in activated HT-2 cells using a specific NFATp polyclonal antibody. *J.Biol.Chem.* **270**: 22602-22607.
- Ryffel B, Weber E, Mihatsch MJ. 1994.** Nephrotoxicity of immunosuppressants in rats: comparison of macrolides with cyclosporin. *Exp. Nephrol.* **2**: 324-333.

- Saavedra JM, Grobecker H, Axelrod J. 1978.** Changes in central catecholaminergic neurons in the spontaneously (genetic) hypertensive rat. *Circ.Res.* **42**: 529-534.
- Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. 1994.** RAFT1 : a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* **78**: 35.
- Salmeron A, Ahmad TB, Carlile GW, Pappin D, Narsimhan RP, Ley SC. 1996.** Activation of MEK-1 and SEK-1 by Tpl-2 proto-onc9protein, a novel MAP kinase kinase kinase. *EMBO* **15**: 817-826.
- Saltzman LE, Moss J, Berg RA, Hom B, Crystal RG. 1982.** Modulation of collagen production by fibroblasts: effects of chronic exposure to agonists that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem.J.* **204**: 25-30.
- Salvemini D. 1997.** Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. *Cell.Mol.Life Sci.* **53**: 576-582.
- Sanai T, Kimura G. 1996.** Renal function reserve and sodium sensitivity in essential hypertension. *J.Lab.clin.Med.* **128**: 89-97.
- Sanchez A, Vidal MJ, Martinez-Sierra R, Saiz J. 1986.** Ontogeny of renal alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in the spontaneously hypertensive rat. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **237**: 972-979.
- Sander M, Victor RG. 1995.** Hypertension after cardiac transplantation: Pathophysiology and management. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* **4**: 443-451.
- Sander M, Lyson T, Thomas GD, Victor RG. 1996.** Sympathetic neural mechanisms of Cyclosporine-induced Hypertension. *Am.J.Hypertens.* **9**: S121-S138.
- Schnabel RF, Wait BR, Kahng UK. 1990.** The relationship of urinary thromboxane excretion to CsA nephrotoxicity. *Transplantation* **51**: 681-689.
- Schnackenberg CG, Tabor BL, Strong MH, Granger JP. 1997.** Inhibition of intrarenal NO stimulates renin secretion through a macula densa-mediated mechanism. *Am.J.Physiol.* **272**: R879-R886.
- Schnackenberg CG, Welch WJ, Wilcox CS. 1998.** Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension* **32**: 59-64.
- Schnermann J. 1998.** Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *Am.J.Physiol.* **274**: R263-R279.
- Schricker K, Hamann M, Kurtz A. 1995a.** Prostaglandins are involved in the stimulation of renin gene expression in 2 kidney-1 clip rats. *Pflügers Arch.* **430**: 188-194.
- Schricker K, Hamann M, Kurtz A. 1995b.** Nitric oxide and prostaglandins are involved in the macula densa control of the renin system. *Am.J.Physiol.* **269**: F825-F830.
- Schricker K, Kurtz A. 1996.** Blockade of nitric oxide formation inhibits the stimulation of the renin system by a low salt intake. *Pflügers Arch.* **432**: 187-191.
- Schricker K, Pötl B, Hamann M, Kurtz A. 1996.** Coordinate changes of renin and brain-type nitric-oxide-synthase (bNOS) mRNA levels in the kidney of rats. *Pflügers Arch.* **432**: 389-400.
- Schuler W, Sedrani R, Cottens S, Häberlein B, et al.. 1997.** SDZ-RAD, a new rapamycin derivate. *Transplantation* **64**: 36-42.
- Sehgal SN. 1995.** Rapamune (sirolimus, rapamycin): an overview and mechanism of action. *Ther.Drug.Monit.* **17**: 660.
- Sehgal SN. 1998.** Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus) : Mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin.Biochem.* **31**: 335-340.
- Sen S, Smeby R, Bumpus FM. 1972.** Renin in rats with spontaneous hypertension. *Circulation Res.* **31**: 876-880.
- Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR. 1988.** Identification of a putative regulator of early T-cell activation genes. *Science* **241**: 202-205.



- Shihab FS, Andoh TF, Tanner AM, Noble NA, Border WA, Franceschini N, et al.. 1996.** Role of transforming growth factor  $\beta$ 1 in experimental chronic cyclosporine nephropathy. *Kidney.Int.* **49**: 1141-1151.
- Shihab FS, Bennett WM, Tanner AM, Andoh TF. 1997.** Mechanism of fibrosis in experimental tacrolimus nephrotoxicity. *Transplantation* **64**: 1829-1837.
- Shiono K, Sokabe H. 1976.** Renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats. *Am.J.Physiol.* **231**: 1295-1299.
- Siegl H, Ryffel B. 1982.** Effect of cyclosporine on renin-angiotensin system. *Lancet* **2**: 1478-1481.
- Sigal NH, Dumont F, Durette P, et al.. 1991.** Is cyclophilin involved in the immunosuppressive and nephrotoxic mechanisms of action of cyclosporin A? *J.Exp.Med.* **173**: 619-628.
- Simmons DL, Levy DB, Yannoni Y, Erikson RL. 1989.** Identification of a phorbol ester-repressible v-src-inducible gene. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **86**: 1178-1182.
- Simmons DL, Xie W, Chipman JG, Evett GE. 1992.** Multiple cyclooxygenases: cloning of a mitogen inducible form. In: Bailey GM, ed. Prostaglandins, Leukotrienes, Lipoxins and PAF. *NY Plenum Press* 67-78.
- Singh I, Grams M, Wang WH, Yang T, Killen P, Smart A, Schnermann J, Briggs JP. 1996.** Coordinate regulation of renal expression of nitric oxide synthase, renin, and angiotensinogen mRNA by dietary salt. *Am.J.Physiol.* **270**: 1027-1037.
- Skott O. 1986.** Episodic release of renin from single isolated superperfused rat afferent arterioles. *Pflügers Arch.* **407**: 41-45.
- Smith WL, Bell TG. 1978.** Immunohistochemical localisation of the prostaglandin-forming cyclooxygenase in renal cortex. *Am.J.Physiol.* **235**: F451-F457.
- Smith WL, De Witt DL, Garavito RM. 2000.** Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Ann.Rev.Biochem.* **69**: 145-182.
- Smith WL, Garavito RM, De Witt DL. 1996.** Prostaglandin Endoperoxide H synthase (Cyclooxygenase)-1 and -2. *J.Biol.Chem.* **271**: 33157-33160.
- Smith TL, Hutchins PM. 1979.** Central hemodynamics in the developmental stage of spontaneous hypertension in the unanesthetized rat. *Hypertension* **1**: 508-517.
- Smith WL, Meade EA, De Witt DL. 1994.** Interactions of PGH synthase isozymes-1 and -2 with NSAIDs. *Ann. NY Acad.Sci.* **744**: 50-57.
- Sokabe H. 1966.** Renin activity of the kidney in the spontaneously hypertensive rat. *Japan.J.Physiol.* **16** : 380-388.
- Stamler J, Stamler R, Neaton JD. 1993.** Blood pressure, systolic and diastolic, and cardiovascular risks. US population data. *Arch.Intern.Med.* **153**: 598-615.
- Stemmer PM, Klee CB. 1994.** Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry* **33**: 6859-6866.
- Stillman IE, Andoh TF, Burdman EA, Bennett WM, Rosen S. 1995.** FK506 nephrotoxicity : Morphologic and physiologic charakterisation of a rat model. *Lab.Invest.* **73**: 794-803.
- Sturrok NDC, Lang CC, Struthers AD. 1993.** Cyclosporine-induced hypertension precedes renal dysfunction and sodium retention in man. *J.Hypertens.* **11**: 1209-1216.
- Su Q, Weber L, Le Hir M, et al.. 1995.** Nephrotoxicity of cyclosporin A and FK506: inhibition of calcineurin phosphatase. *Ren.Physiol.Biochem.* **18**: 128-139.
- Sugimoto T, Haneda M, Sawano H, Isshiki K, Maeda S, Koya D, Inoki K, Yasuda H, Kashiwagi A, Kikkawa R. 2001.** Endothelin-1 induces cyclooxygenase-2 expression via nuclear factor of activated T-cell transcription factor in glomerular mesangial cells. *J.Am.Soc.Nephrol.* **12**: 1359-1368.

- Susic D, Francischetti A, Frohlich ED. 1999.** Prolonged L-arginine on cardiovascular mass and myocardial hemodynamics and collagen in aged spontaneously hypertensive rats and normal rats. *Hypertension* **33**: 451-455.
- Szemerédi K, Bagdy G, Stull R, Keiser HR, Kopin IJ, Goldstein DS. 1988.** Sympathoadrenomedullary hyper-responsiveness to yohimbine in juvenile spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* **43**: 1063-1068.
- Tagawa T, Dampney RA. 1999.** AT(1) receptors mediate excitatory inputs to rostral ventrolateral medulla pressor neurons from hypothalamus. *Hypertension* **34**: 1301-1307.
- Tagawa T, Horiuchi J, Potts PD, Dampney RA. 1999.** Sympathoinhibition after angiotensin receptor blockade in the rostral ventrolateral medulla is independent of glutamate and gamma-aminobutyric acid receptors. *J.Auton.Nerv.Syst.* **77**: 21-30.
- Takahara S, Jiang H, Ishibashi M, Okuyama A, Sonoda T. 1991.** Survival of cardiac allograft in highly sensitized and nonsensitized rats treated with FK 506. *J.Clin.Lab.Immunol.* **34**: 179-181.
- Takeda Y, Miyamori I, Furukawa K, Inaba S, Mabuchi H. 1999.** Mechanisms of FK 506-induced hypertension in the rat. *Hypertension* **33**: 130-136.
- Taugner R, Bührle CP, Hackenthal E, Mannek E, Nobiling R. 1984a.** Morphology of the juxtaglomerular apparatus. *Contr.Nephrol.* **43**: 76-101.
- Taugner R, Bührle CP, Nobiling R. 1984b.** Ultrastructural changes associated with renin secretion from the juxtaglomerular apparatus of mice. *Cell Tissue Res.* **237**: 459-472.
- Textor SC, Canzanello VJ, Taler SJ, et al.. 1994.** Cyclosporine-induced hypertension after transplantation. *Mayo Clin.Proc.* **69**: 1182.
- Textor SC, Taler SJ, Canzanello VJ, Schwartz L, Augustine JE. 2000.** Posttransplantation hypertension related to calcineurin inhibition. *Liver Transpl.* **6**: 521-530.
- Textor SC, Wiesner R, Wilson DJ, et al.. 1993.** Systemic and renal hemodynamic differences between FK506 and cyclosporine in liver transplant recipients. *Transplantation* **55**: 1332-1339.
- The US Multicenter FK506 Liver Study Group. 1994.** A comparison of tacrolimus for immunosuppression in liver transplantation. *N.Engl.J.Med.* **331**: 1110-1115.
- Thomas S, Andoh TF, Pichler RH, Shankland SJ, Couser WG, Bennett WM, Johnson RJ. 1998.** Accelerated apoptosis characterizes cyclosporine-associated interstitial fibrosis. *Kidney Int.* **53**: 897-908.
- Thomson SC, Tucker BJ, Gabbai F, Blantz RC. 1989.** Functional effects on glomerular hemodynamics of short-term chronic cyclosporine in male rats. *J.Clin.Invest.* **83**: 960-969.
- Tojo A, Zhang L, Wilcox CS, Welch WJ, Tisher CC, Madsen KM, Gross SS, Schmidt HH. 1992.** Abstract: Differential localization and regulation of nitric oxide synthase isoforms in the juxtaglomerular apparatus. *J.Am.Soc.Nephrol.* **3**: 554.
- Traynor TR, Smart A, Briggs JP, Schnermann J. 1999.** Inhibition of macula densa-stimulated renin secretion by pharmacological blockade of cyclooxygenase-2. *Am.J.Physiol.* **277**: F706-F710.
- Tsuda K, Kuchii M, Nishio I, Masuyama Y. 1987.** Presynaptic  $\alpha_2$ -adrenoceptor mediated regulation of norepinephrine release in perfused mesenteric vasculatures in young and adult spontaneously hypertensive rats. *Jpn.Circ.J* **51**: 25-32.
- Tumlin JA. 1997.** Expression and function of calcineurin in the mammalian nephron: physiological roles, receptor signaling and ion transport. *Am.J.Kidney.Dis.* **30**: 884-895.
- Tumlin JA, Someren JT, Swanson CE, Lea JP. 1993.** Expression of calcineurin activity and alpha-subunit isoforms in specific segments of the rat nephron. *Am.J.Physiol.* **269**[4,Pt 2]: F558-F563.
- Ujiie K, Yuen J, Hogarth L, Dazinger R, Star RA. 1994.** Localization and regulation of endothelial NO synthase mRNA expression in rat kidney. *Am.J.Physiol.* **267**: F296-F302.

- Van Duyne GD, Standaert RF, Karplus PA, Schreiber SL, Clardy J. 1991.** Anatomic structure of FKBP-FK506, an immunophilin-immunosuppressant complex. *Science* **252**: 839.
- Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F. 1998.** Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **31**: 1248-1254.
- Verhagen AMG, Koomans HA, Joles JA. 2001.** Predisposition of spontaneously hypertensive rats to develop renal injury during nitric oxide synthase inhibition. *Eur.J.Pharmacol* **411**: 175-180.
- Vio CP, Cespedes C, Gallardo P, Masferrer JL. 1998.** Renal identification of cyclooxygenase-2 in a subset of thick ascending limb cells. *Hypertension* **30**: 687-692.
- Wagner C, Goedecke A, Ford M, Schnermann J, Schrader J, Kurtz A. 2000.** Regulation of renin gene expression in kidneys of eNOS- and nNOS-deficient mice. *Pflügers Arch.* **439**: 567-562.
- Wagner C, Hinder M, Krämer BK, Kurtz A. 1999.** Role of renal nerves in the stimulation of the renin system by reduced renal arterial pressure. *Hypertension* **34**: 1101-1105.
- Wagner C, Jensen BL, Krämer BK, Kurtz A. 1998.** Control of the renal renin system by local factors. *Kidney Int.Suppl.* **67**: S78-S83.
- Wagner C, Kees F, Krämer BK, Kurtz A. 1997.** Role of sympathetic nerves for the stimulation of the renin system by angiotensin II receptor blockade. *J.Hypertens.* **15**: 1463-1469
- Walker L, Fröhlich JC. 1987.** Renal prostaglandins and leukotrienes. *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.* **107**: 1-72.
- Wang JH, Desai R. 1976.** A brain protein and its effect on the  $Ca^{2+}$  and protein modulator activated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **72**: 926-932.
- Wantanabe Y, Perrino BA, Chang BH, Soderling TR. 1995.** Identification in the calcineurin A subunit of the domain that binds the regulatory B subunit. *J.Biol.Chem.* **270**: 456-460.
- Ward LE, Hunter LW, Grabau CE, Tyce GM, Rorie OK. 1996.** Nitric oxide reduces basal efflux of catecholamines from perfused dog adrenal glands. *J.Auton..Nerv.Syst.* **61**: 235-242.
- Welch WJ, Tojo A, Lee JU, Kang DG, Schnackenberg CE, Wilcox CS. 1999.** Nitric oxide synthase in the JGA of the SHR: expression and role in tubuloglomerular feedback. *Am.J.Physiol.* **277 (Renal Physiol. 46)** : F130-F138.
- Wellenhofer T. 1994.** Pharmakologische Untersuchungen zur Wirkung der Immunsuppressiva Cyclosporin A und FK506 auf das sympatho-adrenale System.
- Werning C. 1997.** Medizin für Apotheker: ein Handbuch mit Grundwissen für die Praxis. Stuttgart; *Wiss.Verl.-Ges.*.
- WHO/ISH-Guidelines-Subcommittee. 1999.** 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Subcommittee. *J.Hypertens.* **17**: 151-183.
- Wilcox CS, Welch WJ, Murad F, Gross SS, Taylor G, Levi R, Schmidt HH. 1992.** Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proc.Natl.Acad. Sci.USA* **89**: 11993-11997.
- Williams CS, Du Bois RN. 1996.** Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am.J.Physiol.* **270**: G393-G400.
- Wolf K, Castrop H, Hartner A, Goppelt-Strübe M, Hilgers KF, Kurtz A. 1999.** Inhibition of the renin-angiotensin system upregulates cyclooxygenase-2 expression in the macula densa. *Hypertension* **34**: 503-507.
- Wong PC, Price W Jr, Chiu AT, Duncia JV, Carini DJ, Wexler RR, et al.. 1990.** Hypotensive action of DuP 753, an angiotensin II antagonist, in spontaneously hypertensive rats. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: X. *Hypertension* **15**: 459-468.
- Wu F, Park F, Cowley AW Jr, Mattson DL. 1999.** Nitric oxide synthase activity in microdissected segments of the Sprague Dawley rat kidney. *Am.J.Physiol.* **276**: F874-F881.

- Xiao J, Pang PK. 1996.** Activation of nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells and macrophages during development in spontaneously hypertensive rats. *Am.J.Hypertens.* **9**: 377-384.
- Xie W, Fletcher BS, Andersen RD, Herschman HR. 1994.** v-src induction of the TIS10/PGS2 prostaglandin synthase gene is mediated by an ATF/CRE transcription response element. *Mol.Cell.Biol.* **14**: 6531-6539.
- Yamamoto K, Arakawa T, Ueda N, Yamamoto S. 1995.** Transcriptional roles of nuclear factor B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *J.Biol.Chem.* **270**: 31315-31320.
- Yamazaki J, Fujita N, Nagao T. 1991.** N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine-induced pressor response at developmental and established stages in spontaneously hypertensive rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **259**: 52-57.
- Yang T, Endo Y, Huang YG, Smart A, Briggs JP, Schnermann J. 2000.** Renin expression in COX-2-knockout mice on normal or low-salt diets. *Am.J.Physiol.Renal.Physiol.* **279**: F819-F825.
- Yang T, Huang Y, Heasley LE, Berl T, Schnermann JB, Briggs JP. 2000.** MAPK mediation of hypertonicity-stimulated cyclooxygenase-2 expression in renal medullary collecting duct cells. *J.Biol.Chem.* **275**: 23281-23286.
- Yang T, Sing I, Pham H, Sun D, Smart A, Schnermann JB, Briggs JP. 1998.** Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. *Am.J.Physiol.* **274**[3,Pt 2]: F481-F489.
- Yang X, Hou F, Taylor L, Polgar P. 1997.** Characterization of human cyclooxygenase 2 gene promoter localisation of a TGF- $\beta$  response element. *Biochem.Biophys.Acta.* **1350**: 287-292.
- Youngleman F, Kahng UK, Rosen DB, Dresner SL, Wait BY. 1991.** Effects of chronic cyclosporine administration on renal blood flow and intrarenal flow distribution. *Transplantation* **51**: 503-509.
- Yu H, Di Nicolantonio R. 1996.** Altered age-dependent modulation of tissue renin messenger RNA levels in the spontaneously hypertensive rat. *J.Hypertens.* **14**: 871-880.
- Zeier M, Mandelbaum A, Ritz E. 1998.** Hypertension in the transplanted patient. *Nephron* **80**: 257.
- Zhang J, Steiner JP. 1995.** Nitric oxide synthase, immunophilins and poly (ADP-ribose) synthetase: novel targets for the development of neuroprotective drugs. *Neurol.Res.* **17**: 285-288.
- Zhang W. 2002.** Old and new tools to dissect calcineurin's role in pressure-overload cardiac hypertrophy. *Cardiovasc.Res.* **53**: 294-303.
- Zhang W, Victor RG. 2000.** Calcineurin inhibitors cause renal afferent activation in rats: a novel mechanism of cyclosporine-induced hypertension. *Am.J.Hypertens.* **13**: 999-1004.
- Ziccha J, Kuneš J. 1999.** Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. *Physiol.Rev.* **79**: 1227-1282.
- Zimmermann BG, Dunham EW. 1997.** Tissue renin-angiotensin system: A site of drug action. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **37**: 53-69.

## 10 Anhang

## 10.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 01</b>	Zusammenhang zwischen der Höhe des systolischen Blutdruckes und der Sterberate an Herz-Kreislauf-Erkrankungen.	10
<b>Abb. 02</b>	Schema der Blutdruckregulation.	12
<b>Abb. 03</b>	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).	16
<b>Abb. 04</b>	Physiologische Regulation der Reninsekretion.	17
<b>Abb. 05</b>	Die bifunktionelle Rolle der Cyclooxygenase.	21
<b>Abb. 06</b>	Molekularer Wirkmechanismus von Calcineurin-Inhibitoren.	29
<b>Abb. 07</b>	Calcineurin in der T-Zelle.	35
<b>Abb. 08</b>	Calcineurin-Hemmung in nicht immunkompetenten Zellen.	35
<b>Abb. 09</b>	Standardgerade zur quantitativen Bestimmung des Proteingehalts nach Lowry.	50
<b>Abb. 10</b>	Nach Amersham Life Science: The principles of ECL Western Blotting.	54
<b>Abb. 11</b>	Oxidation des 3,4-Dihydroxyphenylrings zum 3,4-ortho-Chinonderivat.	55
<b>Abb. 12</b>	Umwandlung von Kreatin zu Kreatinin.	58
<b>Abb. 13</b>	Entwicklung von Körpergewicht, Futter- und Wasserverbrauch bei SHR und WKY (n = 6, x ± SEM; ★p<0,05 vs WKY ).	61
<b>Abb. 14</b>	Altersentwicklung von Blutdruck und Herzfrequenz bei SHR und WKY (n = 6, x ± SEM; ★p<0,05 vs WKY).	62
<b>Abb. 15</b>	Relatives Herzgewicht und β-/α-Myosin-Ratio im Herzen bei SHR und WKY (n = 6, x ± SEM; ★p<0,05 vs WKY).	62
<b>Abb. 16</b>	Relatives Nierengewicht bei 7 Wochen alten SHR und WKY (n = 6, x ± SEM).	63
<b>Abb. 17</b>	Katecholamine in der Nierenrinde bei 7 Wochen alten SHR und WKY (n = 6, x ± SEM).	63
<b>Abb. 18</b>	Renin mRNA Genexpression (A), Plasmarenin-Aktivität (B) und Plasmaaldosteron-Konzentration (C) bei 3 und 7 Wochen alten SHR und WKY (n = 6, x ± SEM; ★p<0,05 vs WKY ; † p<0,05 vs 3 Wochen).	64
<b>Abb. 19</b>	Organverteilung der COX-1 bei 7 Wochen alten Tieren (n = 6, x ± SEM).	65
<b>Abb. 20</b>	Organverteilung der COX-2 bei 7 Wochen alten Tieren (n = 6, x ± SEM; ★p<0,05 vs WKY).	66
<b>Abb. 21</b>	COX-1 und COX-2 Genexpression in den Nierenzonen 3 und 7 Wochen alter SHR und WKY (n = 6, x ± SEM; ★p<0,05 vs WKY ; † p<0,05 vs 3 Wochen).	67
<b>Abb. 22</b>	Proteinexpression von COX-1 und COX-2 in der Nierenrinde 3 und 7 Wochen alter SHR und WKY (n = 6, x ± SEM; † p<0,05 vs 3 Wochen).	68
<b>Abb. 23</b>	PGE <sub>2</sub> in der Nierenrinde 3 und 7 Wochen alter SHR und WKY (n = 6, x ± SEM).	68
<b>Abb. 24</b>	Organverteilung der eNOS bei 7 Wochen alten Tieren (n = 6, x ± SEM; ★p<0,05 vs WKY).	69
<b>Abb. 25</b>	Organverteilung der nNOS bei 7 Wochen alten Tieren (n = 6, x ± SEM; ★p<0,05 vs WKY).	70
<b>Abb. 26</b>	eNOS und nNOS Genexpression in den Nierenzonen 3 und 7 Wochen alter SHR und WKY (n = 6, x ± SEM; ★p<0,05 vs WKY ; † p<0,05 vs 3 Wochen).	71
<b>Abb. 27</b>	eNOS und nNOS Proteinexpression in der Nierenrinde 3 und 7 Wochen alter SHR und WKY (n = 6, x ± SEM; ★p<0,05 vs WKY ; † p<0,05 vs 3 Wochen).	72
<b>Abb. 28</b>	Hämatokrit bei 7 Wochen alten SHR und WKY (n = 6, x ± SEM).	72
<b>Abb. 29</b>	Entwicklung von Körpergewicht, Futter- und Wasserverbrauch bei Immunsuppression (n = 6, x ± SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle).	78
<b>Abb. 30</b>	Beeinflussung von Blutdruck und Herzfrequenz durch Immunsuppressiva (n = 6, x ± SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle).	79

<b>Abb. 31</b>	Beeinflussung von relativem Herzgewicht (A) und $\beta$ -/ $\alpha$ -Myosin-Ratio im Herzen (B) durch Immunsuppressiva (n = 6, x $\pm$ SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle).	80
<b>Abb. 32</b>	Beeinflussung des relativen Nierengewichts durch Immunsuppressiva (n = 6, x $\pm$ SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle).	80
<b>Abb. 33</b>	Beeinflussung von Plasmakreatinin und Hämatokrit durch Immunsuppressiva (n = 6, x $\pm$ SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle).	81
<b>Abb. 34</b>	Beeinflussung der Katecholamine Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin im Nierencortex durch Immunsuppressiva (n = 6, x $\pm$ SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle).	81
<b>Abb. 35</b>	Genexpression der COX-1 und COX-2 in den Nierenzonen bei Immunsuppression (n = 6, x $\pm$ SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle).	82
<b>Abb. 36</b>	COX-1 Proteinexpression bei Immunsuppression (n = 6, x $\pm$ SEM).	83
<b>Abb. 37</b>	COX-2 Proteinexpression bei Immunsuppression (n = 6, x $\pm$ SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle).	83
<b>Abb. 38</b>	Immunhistochemische Färbung der COX-2 in Nierenpapille und Nierencortex.	84
<b>Abb. 39</b>	PGE <sub>2</sub> Gehalt der Nieren bei Immunsuppression (n = 6, x $\pm$ SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle).	85
<b>Abb. 40</b>	Beeinflussung der Renin mRNA Genexpression, der Plasmaparenin-Aktivität und der Plasmaaldosteron-Konzentration durch Immunsuppressiva (n = 6, x $\pm$ SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle).	86
<b>Abb. 41</b>	Gen- und Proteinexpression von eNOS und nNOS in der Nierenrinde bei Immunsuppression (n = 6, x $\pm$ SEM).	87
<b>Abb. 42</b>	Entwicklung von Körpergewicht, Futter- und Wasserverbrauch bei Stimulation von RAS und COX-2 (n = 6, x $\pm$ SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle; † p<0,05 vs NS; ‡ p<0,05 vs LS).	91
<b>Abb. 43</b>	Beeinflussung von Blutdruck und Herzfrequenz bei Stimulation von RAS und COX-2 (n = 6, x $\pm$ SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle; † p<0,05 vs NS; ‡ p<0,05 vs LS).	92
<b>Abb. 44</b>	Beeinflussung des relativen Nierengewichts bei Stimulation von RAS und COX-2 (n = 6, x $\pm$ SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle; † p<0,05 vs NS; ‡ p<0,05 vs LS).	93
<b>Abb. 45</b>	Beeinflussung von Plasmakreatinin und Hämatokrit bei Stimulation von RAS und COX-2 (n = 6, x $\pm$ SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle; † p<0,05 vs NS; ‡ p<0,05 vs LS).	93
<b>Abb. 46</b>	Katecholamine in der Nierenrinde bei Stimulation von RAS und COX-2 (n = 6, x $\pm$ SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle; † p<0,05 vs NS; ‡ p<0,05 vs LS).	93
<b>Abb. 47</b>	Genexpression von COX-1 und COX-2 in der Nierenrinde bei Stimulation der COX-2 (n = 6, x $\pm$ SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle; † p<0,05 vs NS; ‡ p<0,05 vs LS).	94
<b>Abb. 48</b>	Proteinexpression von COX-1 und COX-2 in der Nierenrinde bei Stimulation der COX-2 (n = 6, x $\pm$ SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle; † p<0,05 vs NS; ‡ p<0,05 vs LS).	94
<b>Abb. 49</b>	Immunhistochemische Färbung der COX-2 in der Nierenrinde.	95
<b>Abb. 50</b>	COX-2 Immunoreaktivität in der Nierenrinde bei Stimulation der COX-2 (n = 6, x $\pm$ SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle; † p<0,05 vs NS; ‡ p<0,05 vs LS).	95
<b>Abb. 51</b>	PGE <sub>2</sub> Gehalt der Nierenrinde bei Stimulation der COX-2 (n = 6, x $\pm$ SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle; † p<0,05 vs NS; ‡ p<0,05 vs LS).	96
<b>Abb. 52</b>	Renin Genexpression und Plasmaaldosteron bei Stimulation von RAS und COX-2 (n = 6, x $\pm$ SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle; † p<0,05 vs NS; ‡ p<0,05 vs LS).	96
<b>Abb. 53</b>	Immunhistochemische Färbung von Renin in der Nierenrinde bei Stimulation von RAS und COX-2.	97

- Abb. 54** Genexpression von eNOS und nNOS bei Stimulation von RAS, COX-2 und nNOS (n = 6,  $x \pm \text{SEM}$ ; ★ $p < 0,05$  vs Kontrolle; †  $p < 0,05$  vs NS; ‡  $p < 0,05$  vs LS). 98
- Abb. 55** Proteinexpression von eNOS und nNOS bei Stimulation von RAS, COX-2 und nNOS (n = 6,  $x \pm \text{SEM}$ ; ★ $p < 0,05$  vs Kontrolle; †  $p < 0,05$  vs NS; ‡  $p < 0,05$  vs LS). 99

## 10.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 01</b>	Normotone versus hypertone Blutdruckwerte in Anlehnung an die WHO/ISH-Leitlinie (WHO/ISH-Guidelines-Subcommittee, 1999).	11
<b>Tab. 02</b>	Risikofaktoren zur Risikostratifizierung bei Hypertonie.	11
<b>Tab. 03</b>	Weiter Risikofaktoren, Parameter für Endorganschäden und Folge- und Begleitkrankheiten der Hypertonie.	11
<b>Tab. 04</b>	Die 3 Hauptwirkungen von Angiotensin II.	16
<b>Tab. 05</b>	Regulation des Reninsystems durch humorale und lokale Faktoren.	18
<b>Tab. 06</b>	Lokalisation der eNOS- und nNOS-Isoenzyme in der Niere.	20
<b>Tab. 07</b>	Expression der Cyclooxygenase-Isoenzyme in der Niere.	23
<b>Tab. 08</b>	Die chemische Struktur der Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus.	28
<b>Tab. 09</b>	Die chemische Struktur der mTOR-Hemmer Rapamycin und SDZ-RAD.	30
<b>Tab. 10</b>	Inzidenz der Hypertonie und Nephrotoxizität bei Immunsuppression mit Calcineurin-Inhibitoren.	34
<b>Tab. 11</b>	Übersicht der Ergebnisse zur genetischen Hypertonie.	73
<b>Tab. 12</b>	Blutdruck und Herzfrequenz nach 10-tägiger Immunsuppression.	79
<b>Tab. 13</b>	Übersicht der Ergebnisse zur Immunsuppressiva-induzierten Hypertonie.	88
<b>Tab. 14</b>	Blutdruck und Herzfrequenz am 7. Tag der Stimulation (n = 6, x ± SEM; ★p<0,05 vs Kontrolle; † p<0,05 vs NS; ‡ p<0,05 vs LS).	92
<b>Tab. 15</b>	Übersicht der Ergebnisse zum Einfluss von Cyclosporin A auf die Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems und der renalen COX-2- und nNOS-Isoenzyme.	100



### 10.3 Abkürzungsverzeichnis

% (m/v)	Gehaltsangabe des DAB: Massenprozent pro Volumen (100ml) (Konzentrationsangabe)
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adrenalin
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin Conversions Enzym
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon, Adiuretin, Vasopressin
ADP	Adenosindiphosphat
ANG I/II	Angiotensin I/II
AP-1	Heterodimer der Proteine FOS und JUN
APS	Aluminiumperoxiddisulfat
AS	Aminosäure
AT <sub>1</sub>	Angiotensin-1-Rezeptor
ATF	Aktivierende Transkriptionsfaktoren
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Blutdruck
bp	Basenpaare
BP	Blutdruck
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CA	Katecholamine
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
<i>c-fos</i>	ein Proto-Onkogen
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat
CH	Schweiz
cm	Zentimeter
<i>c-myc</i>	ein Proto-Onkogen
CO	Nierencortex
cpm	counts per minute
CRE	cAMP Response Element
<i>c-rel</i>	ein Proto-Onkogen
cRNA	Copy-Ribonukleinsäure
CsA	Cyclosporin A
COX-1	Cyclooxygenase 1
COX-2	Cyclooxygenase 2
CyP	Cyclophilin
D	Dopamin
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAG	Diacylglycerol
DBA	3,4-Dihydroxy-benzylaminhydrobromid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desonucleosidtriphosphat
E	Extinktion
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat
EGF	Epidermal-Growth-Factor
EGTA	Ethylenglycol-Bisaminoethylether-Tetraessigsäure
EIA	Enzyme Immunosorbent Assay
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum

EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FKBP 12/12A	FK506 bindende Proteine
FK506/FK-506	Tacrolimus
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G <sub>0</sub>	cytokinetische Ruhephase des Zellzyklus
G <sub>1</sub>	präsynthetische Wachstumsphase des Zellzyklus
G <sub>2</sub>	postsynthetische Wachstumsphase des Zellzyklus
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G <sub>i</sub>	inhibitorisches G-Protein
GM-CSF	Granulozyten-Macrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
G <sub>s</sub>	stimulatorisches G-Protein
GSH	Glutathion
GSK-3	eine Calcineurin-phosphorylierende Kinase
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HE	Hämalaun-Eosin
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
HS	High Salt, Hochsalz-Nahrung
I <sup>125</sup>	Iod <sup>125</sup>
i.d.R.	in der Regel
I.E.	Internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G
IL-2/IL-4/IL-6	Interleukin-2/-4/-6
IM	Innere Medulla
INF $\gamma$	Interferon $\gamma$
IP <sub>3</sub>	Inositol-trisphosphat
IS	Interner Standard
ISH	International Society of Hypertension
JG	Juxtaglomerulär
kDa	Kilo Dalton
K-EDTA	Kalium-EDTA
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
Konz.	Konzentration
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Liq.	Liquidum
LS	Low Salt, Niedrigsalz-Nahrung
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MBD	Membran-bindenden Domäne
MD	Macula densa
mg	Milligramm
mG	Molekulargewicht
MHC	Major Histocompatibility Complex
min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar

mmol	Millimol
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
mTOR	Mamalian Target of Rapamycin
n	Anzahl
N	Normal
Na	Natrium
NA	Noradrenalin
Na-Ac	Natriumacetatlösung
NaCl	Kochsalz
NaOH	Natronlauge
NFAT	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NFATc	katalytische Untereinheit von NFAT
NF-IL-6/CEBP	NF-IL-6/CCAAT-Enhancer-Binding-Protein
NFkB	Nukleärer Faktor kB
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS I	NO-Synthase I (nNOS)
NOS III	NO-Synthase III (eNOS)
NS	Normal Salt, Normalsalz-Nahrung
Oap	Oktameren-aktivierendes Protein
OD	Optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P	Phosphor
PBL	periphere Blutlymphozyten
PAC	Plasmaaldosteron-Konzentration
PCA	Perchlorsäure
PGE <sub>2</sub> /PGG <sub>2</sub> /PGH <sub>2</sub> /PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub> /G <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> /I <sub>2</sub>
PHAS-I	Fas, APO-1, Todesligand
PKC	Proteinkinase C
PRA	Plasmarenin-Aktivität
RA	Ramipril
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
sBP	systolischer Blutdruck
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDZ-RAD	(40-O-(2-Hydroxyethyl)- Rapamycin)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SH-Ratte, SHR	Spontan hypertensive Ratte
SOS	Sodiumoctansulfonat
SR	Referenzstandard
Tab.	Tabelle
TALH	Thick ascending limb of Henle, dicker aufsteigender Ast der Henleschen Schleife
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
TGF-β	Tumor-Growth-Factor-β
TIA	Transitorische ischämische Attacken
TNFα	Tumornekrosefaktor α
Tris/TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure

u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VF	Verdünnungsfaktor
vol	Volumen
vs	versus
WHO	World Health Organisation
WKY	Wistar-Kyoto-Ratte
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

**10.4 Lebenslauf****Apothekerin Franziska Dreher**Persönliche Angaben

- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Religion: römisch-katholisch
- Geburtsdatum: 10.04.1974
- Geburtsort: Marktredwitz
- Eltern: Heinz Georg Dreher, Studiendirektor;  
Sonja Ilse Dreher, geb. Sack, Kauffrau;

Schulausbildung

- 1980 – 1984 Volksschule II, Marktredwitz
- 1984 – 1985 Alexander-von-Humboldt Volksschule, Marktredwitz
- 1985 – 1994 Otto-Hahn-Gymnasium, Marktredwitz,

Abschluss: Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife 01.07.94

Studium / Prüfungen

- WS 1994 – SS 1998 Studium der Pharmazie an der Universität Regensburg
- SS 1996 / WS 1996 1. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
- 04/1999 2. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
- 07/2000 3. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
- 07/2000 Approbation als Apothekerin
- 07/2002 Promotion zum Dr. rer. nat.

Beschäftigungsverhältnisse

- 05/1999 – 05/2000 Pharmaziepraktikantin in der Dom-Apotheke, Regensburg
- seit 08/2000 Vertretungen in der Dom-Apotheke, Regensburg
- seit 08/2000 Doktorandin am Lehrstuhl für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Universität Regensburg